

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Histonas del díptero "ceratitis capitata" : estudio de la  
fracción F2 A1**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Julián Perera González**

**Madrid, 2015**

5322342747

577.1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

PER

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

HISTONAS DEL DIPTERO "CERATITIS CAPITATA"

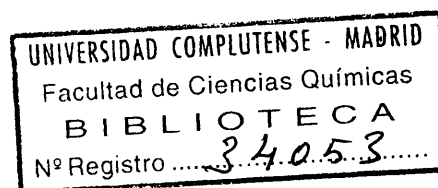
ESTUDIO DE LA FRACCION F2A1

MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas

presenta

JULIAN PERERA GONZALEZ



Madrid, 1975



El presente trabajo se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Luis Franco Vera, a quien quiero expresar mi más profundo agradecimiento por sus enseñanzas y ayuda constante.

Deseo también manifestar mi gratitud al Prof. Dr. D. Angel M. Municio, Director del Departamento de Bioquímica, por el gran interés demostrado hacia el desarrollo de esta investigación.

Agradezco igualmente a mis compañeros del Departamento, en especial a los Profs. M.C. Rojo, J. Navlet, F. Montero, A. Pérez-Aranda, B. Fernández, I. López y G. López, su colaboración y ayuda que tanto han contribuido a la realización de este trabajo.

Madrid, Febrero de 1975



## INDICE

	<u>Página</u>
<b>1. <u>PARTE TEORICA</u></b>	
1.1. <u>INTRODUCCION</u> .....	11
1.1.1. DEFINICION DE HISTONAS .....	11
1.1.2. INTRODUCCION HISTORICA .....	12
1.1.3. FRACCIONES DE HISTONAS .....	14
1.1.4. LOCALIZACION .....	16
1.1.5. FUNCION DE LAS HISTONAS .....	17
1.2. <u>AISLAMIENTO DE HISTONAS</u> .....	21
1.2.1. PREPARACION DE CROMATINA .....	21
1.2.2. AISLAMIENTO DE HISTONA TOTAL .....	24
1.2.2.1. Extracción ácida .....	24
1.2.2.2. Disociación salina .....	25
1.2.3. AISLAMIENTO DE FRACCIONES .....	27
1.2.3.1. Fraccionamiento de histona total .....	27
1.2.3.2. Extracción selectiva .....	28

	<u>Página</u>
1.2.4. PURIFICACION, SUBFRACCIONAMIENTO Y HETEROGENEIDAD .....	32
1.3. <u>IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE HISTONAS</u> .....	34
1.3.1. ELECTROFORESIS EN GEL .....	35
1.3.2. COMPOSICION DE AMINOACIDOS .....	37
1.3.3. OTROS METODOS .....	39
1.4. <u>ESTUDIOS FISICOS Y CONFORMACIONALES</u> .....	40
1.4.1. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR .....	41
1.4.2. RELACIONES ENTRE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE HISTONAS Y SUS POSIBLES CONFORMACIONES .....	43
1.4.3. ESTUDIOS FISICOS DE LA CONFORMACION DE HISTONAS .....	49
1.4.3.1. Estudio de histonas en estado sólido .....	49
1.4.3.2. Estudios de espectroscopía óptica .....	51
1.4.3.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear .....	55
1.5. <u>DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA</u> .....	60
 2. <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
2.1. <u>PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO</u> .....	65
2.2. <u>PREPARACION DE CROMATINA CRUDA</u> .....	65
2.3. <u>AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES</u> .....	66
2.3.1. DISOCIACION SALINA .....	66
2.3.2. EXTRACCION ACIDA .....	68
2.4. <u>EXTRACCION SELECTIVA</u> .....	68
2.4.1. DISOCIACION SELECTIVA CON SALES .....	69
2.4.2. EXTRACCION SELECTIVA CON DISOLVENTES ORGANICOS .....	70

	<u>Página</u>
2.4.2.1. Extracción con etanol-HCl .....	70
2.4.2.2. Extracción con etanol-cloruro de guanidinio .....	71
2.5. <u>FRACCIONAMIENTO DE HISTONAS F2A</u> .....	72
2.5.1. PRECIPITACION FRACCIONADA DEL EXTRACTO ETANOL-GuCl .....	72
2.5.2.1 Precipitación fraccionada de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	73
2.5.2.2. Precipitación fraccionada de HCl .....	74
2.6. <u>PURIFICACION DE HISTONA F2A1</u> .....	74
2.6.1. PURIFICACION DE HISTONA F2A1 POR ELECTROFORESIS PREPARATIVA .....	75
2.6.2. PURIFICACION DE HISTONA F2A1 POR CROMATOGRAFIA EN GEL .....	77
2.7. <u>METODOS ANALITICOS</u> .....	78
2.7.1. VALORACION DEL DNA .....	78
2.7.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	79
2.7.2.1. Electroforesis sencilla .....	79
2.7.2.2. Electroforesis doble .....	82
2.7.3. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES .....	83
2.7.4. ANALISIS DE AMINOACIDOS .....	84
2.7.5. DETERMINACION DEL RESIDUO N-TERMINAL .....	85
2.8. <u>OBTENCION DE DATOS CONFORMACIONALES</u> .....	86
2.8.1. DISOLUCIONES DE PROTEINA .....	86
2.8.2. VARIACION DE LA FUERZA IONICA .....	87
2.8.3. VARIACION DEL pH .....	87
2.8.4. ESPECTROS DE CD .....	88



### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. <u>AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES</u> .....	89
3.1.1. DISOCIACION SALINA .....	89
3.1.2. EXTRACCION ACIDA .....	94
3.1.3. DISCUSION GENERAL DEL AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES .....	96
3.2. <u>FRACCIONAMIENTO</u> .....	101
3.2.1. DISOCIACION SELECTIVA CON SALES .....	102
3.2.2. EXTRACCION SELECTIVA CON ETANOL-HCl .....	104
3.2.3. EXTRACCION SELECTIVA CON ETANOL-CLORURO DE GUA- NIDINIO .....	108
3.2.4. DISCUSION DE UNA IDENTIFICACION PROVISIONAL ...	109
3.3. <u>AISLAMIENTO DE F2A1</u> .....	113
3.3.1. PRECIPITACION FRACCIONADA DEL EXTRACTO ETANOL- GuCl .....	113
3.3.2. PRECIPITACION FRACCIONADA DE DISOLUCION ACIDA .	114
3.3.3. PURIFICACION DE F2A1 .....	117
3.3.4. DISCUSION GENERAL DEL AISLAMIENTO DE F2A1 .....	123
3.4. <u>CARACTERIZACION DE LA HISTONA F2A1</u> .....	129
3.4.1. COMPOSICION DE AMINOACIDOS .....	129
3.4.2. DETERMINACION DEL RESIDUO N-TERMINAL .....	133
3.4.3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR .....	135
3.4.4. IDENTIFICACION DEFINITIVA DE FRACCIONES .....	137
3.5. <u>ESTUDIOS CONFORMACIONALES DE LA HISTONA F2A1</u> .....	138

	<u>Página</u>
3.5.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE HISTONA ..	141
3.5.2. VARIACION DE LA CONFORMACION CON LA FUERZA IONICA .....	143
3.5.3. VARIACION DE LA CONFORMACION CON EL pH .....	151
3.5.4. VARIACION DE LA CONFORMACION CON EL TIEMPO ....	157
3.5.5. DISCUSION GENERAL DE LOS ESTUDIOS CONFORMACIONALES .....	163
4. <u>CONCLUSIONES</u> .....	168
5. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	173



## 1. PARTE TEORICA

### 1.1. INTRODUCCION

=====

#### 1.1.1. DEFINICION DE HISTONAS

Las histonas son proteínas básicas que se encuentran asociadas al DNA, en algún momento del ciclo celular.

Esta definición no hace, deliberadamente, ninguna distinción entre histonas y protaminas. Aunque parece existir una diferencia real entre la función de las proteínas básicas asociadas al DNA del núcleo de las células somáticas -histonas- y la de aquellas asociadas al DNA del núcleo de los espermatozoos -protaminas-, sin embargo no es posible establecer una distinción más rígida, basada en el análisis de aminoácidos, ya que las proteínas de espermatozoo de diferentes especies presentan una considerable variación en su composición.

Por otro lado, la anterior definición trata de cubrir los hechos de que las histonas pueden separarse del DNA en alguna etapa del ciclo celular y que pueden no estar confinadas ex--

clusivamente en el núcleo, especialmente durante su síntesis.

Parece, por consiguiente, que esta definición, aunque un tanto provisional, no puede mejorarse en tanto las funciones de estas proteínas no se determinen totalmente.

### 1.1.2. INTRODUCCION HISTORICA

La investigación de las proteínas básicas del núcleo celular comenzó en 1874, cuando Friedrich Miescher descubrió en el espermatozoide de salmón, una combinación de una sustancia ácida -posteriormente llamada ácido nucleico- con una base orgánica a la que llamó protamina (Miescher, 1874). Albrecht Kossel (1884), en una investigación semejante con eritrocitos de ganso, encontró que el material básico asociado al ácido nucleico era más complejo que la protamina. Kossel aisló esta sustancia básica por extracción de núcleos con ácido clorhídrico diluido, y propuso para ella el nombre de histona.

Stedman y Stedman (1950) fueron los primeros en demostrar que la histona no era una proteína homogénea. Al precipitar, selectivamente, sulfato de histona con etanol, obtuvieron fracciones que mostraban diferencias en su contenido en arginina y lisina, y las designaron como "histonas principales" -ricas en arginina- e "histonas subsidiarias" -ricas en lisina-. Ya estos autores sugirieron que las histonas eran, de hecho, una mezcla de proteínas de propiedades similares.

En 1955, Crampton, Moore y Stein describieron un método para el fraccionamiento de histona por cromatografía en Amberlita IRC 50 (Crampton y col., 1955). Esta fue la primera vez que se logró la separación de componentes de histona usando una resina cambiadora de iones y, aunque sólo pudo ser eluido el componente menos básico, constituyó un avance importante en los métodos de

fraccionamiento de histonas. En 1956, dos grupos de investigadores publicaron los resultados satisfactorios obtenidos al eluir toda la histona aplicada en columnas de resinas cambiadoras de iones. Davison y Shooter (1956) usaron carboximetilcelulosa, y Luck y col., (1956) utilizaron Amberlita IRC 50, y eluyeron las histonas con disoluciones de cloruro de guanidinio. Ambos procedimientos, posteriormente modificados, han supuesto métodos convenientes de fraccionamiento de histonas.

Muchos grupos de investigadores dirigieron su trabajo a la preparación y el fraccionamiento de histonas, caracterizándolas principalmente por el análisis total de aminoácidos, y nombrándolas de muy diferentes formas. La comparación entre las diferentes fracciones era difícil, debido a que el análisis total de aminoácidos, por sí solo, daba poca información acerca de las complejidades relativas de las fracciones obtenidas. La ultracentrifugación y la electroforesis libre daban, igualmente, pobre información acerca de este punto.

La situación se clarificó considerablemente con la aplicación de dos nuevas técnicas a la caracterización de histonas. Neelin y Connell (1959) demostraron que las histonas podían separarse por electroforesis en gel de almidón, lo que hacía posible la comparación de mezclas complejas. Por otra parte Luck y col., (1956) y Phillips (1958) caracterizaron las histonas por medio del análisis del residuo N-terminal. Estas dos técnicas, modificadas en muchos casos por otros investigadores, han demostrado ampliamente su utilidad para la distinción y comparación de las muchas fracciones obtenidas.

Hoy en día, con la utilización de todas las técnicas de que se dispone, las fracciones de histonas pueden ser lo suficientemente caracterizadas como para poder llevar a cabo comparaciones significativas, y está claro que sólo existe un número limitado de fracciones principales de histonas, probablemente menos de

10, aunque también hay que admitir la existencia de componentes secundarios, de pequeños cambios en la secuencia, y de modificaciones metabólicas.

### 1.1.3. FRACCIONES DE HISTONAS

Las histonas son una familia de proteínas muy similares que pueden agruparse en cinco fracciones principales, cada una de las cuales representa, aproximadamente, el 20% de la histona total (Johns, 1967 a). Estas cinco fracciones parecen existir en todas las células somáticas de mamíferos, peces, aves y plantas examinadas, en proporción notablemente constante y en una relación de masa histona/DNA de aproximadamente 1:1.

Normalmente se clasifican atendiendo a la proporción relativa de lisina y arginina (Lys/Arg) en su composición. Existe una fracción muy rica en lisina, denominada F1, otra moderadamente rica en lisina, F2B, dos fracciones ricas en arginina, F2A1 y F3, y una intermedia, F2A2.

Además de estas cinco fracciones principales, se ha encontrado una sexta variedad -F2C- asociada en la cromatina de eritrocitos nucleados (Neelin y col., 1964; Edwards y Hnilica, 1968) y en eritoblastos de pollo (Sotirov y Johns, 1972). Recientemente se ha aislado una proteína soluble en ácido, de movilidad electroforética similar a la de F2C, a partir de hígado (Nelson y Yunis, 1969) y de cristalino (Johnson y Rothstein, 1970) de rana. En la Tabla I se recogen las propiedades y los sistemas de nomenclatura más utilizados para las fracciones individuales de histonas.

Actualmente se conoce que cada una de las cinco principales fracciones de histonas posee alguna microheterogeneidad resultante de pequeñas diferencias en tamaño y carga. Esta heterogeneidad puede deberse a pequeñas variaciones en la estructura prima-

T A B L A   I

Características y sistemas de nomenclatura para las principales fracciones de histona.

Descripción	Nomenclatura			Lys/Arg	Pm
	(1)	(2)	(3)		
Ricas en lisina	F1	I	KAP	21.0 (4)	21.000 (4)
	F2C	V	-	2-3 (5,6)	16.000 (5)
	F2B	IIb2	KAS	2.50 (7)	13.774 (7)
Intermedia	F2A2	IIbI	LAK	1.17 (8,9)	14.003 (8,9)
Ricas en arginina	F2A1	IV	GRK	0.79 (10)	11.279 (10)
	F3	III	ARE	0.72 (11)	15.324 (11)

- (1) Johns y Butler (1962 a)  
 (2) Rasmussen y col. (1962)  
 (3) Huberman (1973)  
 (4) Bustin y Cole (1969)  
 (5) Champagne y col. (1970)  
 (6) Edwards y Hnilica (1968)

- (7) Iwai y col. (1970)  
 (8) Sautiere y col. (1972)  
 (9) Yeoman y col. (1972)  
 (10) DeLange y col. (1968)  
 (11) DeLange y col. (1972)



ria, como en el caso de la histona Fl, o a modificaciones enzimáticas de las cadenas laterales de algunos aminoácidos de las moléculas de histonas. Estas diferencias en estructura se discutirán más adelante.

Además de las fracciones de histonas descritas, se ha aislado recientemente una proteína muy semejante a ellas, a partir de trucha (Wigle y Dixon, 1971) y de tejidos de varios mamíferos (Panyim y Chalkley, 1969). Es un componente menor que representa 0.5-2% de la histona total. El análisis de aminoácidos sugiere que la proteína procedente de trucha y la de mamíferos son similares; aproximadamente el 60% de los residuos son lisina, alanina y prolina.

#### 1.1.4. LOCALIZACION

Las histonas se han encontrado asociadas al DNA en casi todos los organismos eucarióticos examinados hasta el momento.

Actualmente está bien establecido el hecho de que las bacterias no contienen histonas en las cantidades, relativas al DNA, encontradas en organismos multicelulares, aunque existe, sin embargo, la posibilidad de que puedan estar presentes en pequeña cantidad (Leaver y Cruft, 1966; Raaf y Bonner, 1968). Igualmente, estudios llevados a cabo sobre una especie de algas azul-verdosas han demostrado la ausencia de histonas en este organismo (Makino y Tsuzuki, 1971).

Se han aislado histonas muy semejantes a las de mamíferos a partir de organismos unicelulares eucarióticos tales como algas (Iwai, 1964), protozoos (Iwai y col., 1965; Pieri y col., 1968) y levadura (Tonino y Rozijn, 1966; Wintersberger y col., 1973; Franco y col., 1974) y esto probablemente refleje su mayor complejidad unicelular comparada con la de las bacterias.

Sin embargo se ha encontrado que, en algunas especies de hongos y algas dinoflageladas, no están presentes todas las fracciones principales de histonas. Así, Rizzo y Nooden (1972) han encontrado, en la cromatina de dos especies de algas dinoflageladas, sólo el 10% de la proteína soluble en ácido existente en eucariotes superiores. La electroforesis en gel de poliacrilamida revela que aproximadamente el 80% de esta proteína tiene una movilidad similar a la de la histona F2A1, mientras que no aparece ninguna banda semejante a las otras fracciones. Tampoco se han detectado proteínas solubles en ácido en la cromatina de varias especies de hongos (Leighton y col., 1971; Dwivedi y col., 1969).

Más recientemente, Hsiang y Cole (1973) han encontrado dos proteínas básicas asociadas con la cromatina en Neurospora crassa, que se asemejan a histonas moderadamente ricas en lisina y que representan aproximadamente la cuarta parte de la cantidad total de histona encontrada en organismos superiores. Mohberg y Rusch (1970) aislaron un conjunto completo de histonas de núcleos de Physarum polycephalum; estas proteínas están presentes en una relación de masa 1:1 con el DNA, y exhiben una imagen electroforética muy semejante a las histonas de organismos superiores.

#### 1.1.5. FUNCION DE LAS HISTONAS

Las dos clases de proteínas cromosomales, histonas y no-histonas, han sido objeto de estudio durante muchos años. Hoy se acepta que las proteínas cromosomales incluyen los componentes estructurales y enzimáticos necesarios para el mantenimiento y la replicación de los cromosomas. Datos recientes sugieren que algunas de estas proteínas también pueden desempeñar el papel de reguladores de la actividad genética en el proceso de la transcripción. Sin embargo, la identificación de la función específica de cada proteína individual es un problema no resuelto por el momento, así como los mecanismos moleculares según los cuales estas proteínas llevan a cabo su función.

Stedman y Stedman (1951) fueron los primeros en sugerir que las histonas podrían estar implicadas en la expresión selectiva de distintos genes. Mas tarde, Cole (1962) propuso para estas proteínas un papel estructural, responsable del mantenimiento de la estructura de los cromosomas eucarióticos. Ambas hipótesis han sido el foco de muchos estudios que han acumulado una gran información sobre muchas de sus propiedades, pero a pesar de este esfuerzo por comprender la función de las histonas, todavía no se posee una clara visión sobre los papeles precisos que desempeñan y sus mecanismos de acción. En la actualidad se les atribuyen dos funciones principales: las histonas pueden ser responsables del mantenimiento de la estructura de los cromosomas a lo largo del ciclo celular, y/o pueden actuar como represores para la transcripción del DNA.

La segunda posibilidad podría resultar bien de una represión específica, lo que implicaría un proceso de reconocimiento selectivo entre las histonas y algún otro componente cromosomal, probablemente DNA, o bien de un bloqueo no específico de la capacidad de "template" del DNA. A la vista de las fuertes atracciones electrostáticas que existen entre la doble hélice polianiónica del DNA y los múltiples residuos de aminoácidos básicos de las moléculas de histonas, es difícil comprender como una simple variación en la secuencia de bases podría modular, de una forma efectiva, la unión de la histona al DNA. Experimentos de asociación llevados a cabo utilizando sistemas modelo de poli-L-lisina y poli-L-arginina enfrentados a DNA de diferentes composiciones, tienden a apoyar la idea de que las interacciones electrostáticas son las fuerzas primarias en la unión de proteínas básicas al DNA (Leng y Felsenfeld, 1966). Experimentos semejantes utilizando histonas ricas en lisina e histonas ricas en arginina, tampoco revelaron ninguna selectividad en su unión al DNA (Johns y Butler, 1964). Parece, por tanto, improbable que la interacción directa entre histonas y DNA, en condiciones fisiológicas, tenga lugar con alguna especificidad de secuencia. Existe la posibilidad de que una tercera sustancia, quizá proteína no-histona o RNA, pudiera participar en un complejo terna-

rio con histonas y DNA para conferir especificidad a sus interacciones; se ha conseguido alguna evidencia que sugiere que la histona F1 pudiera intervenir en tales complejos (Gottesfeld y col., 1972).

Un segundo mecanismo posible que permitiría a la secuencia de bases influir sustancialmente en la unión histona-DNA "in vivo", estaría basado en la disminución de las atracciones iónicas entre estas macromoléculas, mediante acetilación o fosforilación de las histonas para neutralizar, al menos parcialmente, su basicidad. Sin embargo, la mayor parte de la evidencia acumulada hasta la fecha, está fundamentalmente de acuerdo con la idea de que la función de las histonas no implica un reconocimiento de secuencias de bases específicas en el DNA.

Se puede tratar de relacionar la posible función de las histonas con su aparición en algunos organismos inferiores (ver apartado 1.1.4.). Si estas proteínas son elementos esenciales en la condensación de los cromosomas, se debería esperar su presencia en todos los organismos que atraviesan un estado de metafase en su ciclo celular. Se han encontrado histonas muy semejantes a las de organismos superiores, en eucariontes unicelulares -algas verdes, protozoos, levadura-, en los que la diferenciación es mínima, pero que presentan un ciclo celular completo. Por el contrario, las histonas no están presentes en cantidad detectable, en los cromosomas bacterianos, en los que no ocurre ninguna condensación durante el ciclo celular. Sin embargo, esta correlación no se puede extender a los hongos o algas dinoflageladas, en los que se da una condensación semejante a la producida en la metafase, pero en los que no está presente un conjunto completo de histonas, al menos en todas las especies. Los trabajos de Rizzo y Nooden (1972) en dos especies de algas dinoflageladas, Gyrodinium cohnii y Peridinium trochoideium, y los de Hsiang y Cole (1973) en el mohó Neurospora crassa son ejemplos de esta situación. Parece, por lo tanto que existen casos en los que los cromosomas se encuentran en un

estado condensado, en ausencia de un conjunto completo de histonas. Si esta conclusión no resulta modificada por el posterior hallazgo de histonas en estos organismos, podría establecerse que no es necesaria la presencia de todas las fracciones para la condensación de los cromosomas, aunque esta afirmación no excluye el que las histonas, cuando están presentes, puedan desempeñar un papel activo en la transición de los cromosomas desde el estado de interfase al de metafase.

El intento de establecer una correlación entre el alcance de la diferenciación mostrada por los eucariontes primitivos y su contenido en histona, tampoco conduce a conclusiones definitivas. La comparación de Physarum polycephalum con otros organismos es un ejemplo. Physarum posee un conjunto completo de histonas, pero muestra una diferenciación que es relativamente poco detectable morfológicamente durante su ciclo vital. Esta situación puede contrastarse con la de Neurospora, cuyas células alcanzan un grado comparable de complejidad morfológica, pero en las que están aparentemente ausentes algunos tipos de histonas. La semejanza entre las histonas de Physarum y las de organismos mucho mas complejos, como mamíferos, también sugiere que estas proteínas no son los elementos controladores del desarrollo y la diferenciación.

En resumen, hoy en día existe una gran cantidad de evidencias que indican que las histonas pueden reprimir, y muy probablemente reprimen, la capacidad del DNA para servir como "template" en la síntesis de RNA. Las histonas no parecen capaces de actuar como represores específicos, así, su actuación en la restricción genética debe ser de alguna forma modulada por otras moléculas para conseguir el control selectivo sobre genes individuales o grupos de genes.

## 1.2. AISLAMIENTO DE HISTONAS

=====

La preparación de histonas a partir de un tejido dado, requiere previamente el aislamiento de la cromatina en un estado relativamente puro. En muchos casos, p. ej. timo de ternera, es un procedimiento bastante sencillo que consiste en la rotura de las membranas celular y nuclear, sedimentación de la cromatina por centrifugación, y lavado de la misma con soluciones salinas diluidas. Sin embargo, con otros materiales iniciales, p. ej. insectos, donde la cantidad de cromatina relativa al peso total es pequeña, frecuentemente se hace necesario el empleo de procedimientos que permitan inicialmente una extracción parcialmente selectiva y una consiguiente concentración de la cromatina (Johns y Butler, 1962 b).

### 1.2.1. PREPARACION DE CROMATINA

El método normalmente adoptado para la preparación de cromatina, previa a la extracción de histonas, comienza con el aislamiento de núcleos. Los métodos descritos para este aislamiento son muy numerosos. Todos requieren las siguientes operaciones:

- Homogeneización del tejido, generalmente con un homogeneizador de aspas y en medios acuosos, fundamentalmente citrato o sacarosa isotónica, en presencia de cationes, detergentes, etc.
- Filtración para eliminar trozos de fibras, células enteras, agregados nucleares, etc.
- Centrifugación diferencial para sedimentar los núcleos. En algunos tejidos, la centrifugación en sacarosa isotónica es suficiente para el aislamiento de núcleos puros. Pero en otros casos, insectos p. ej., se requiere una centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Los núcleos aislados se resuspenden en agua o en disoluciones muy diluidas de tampón Tris (Tris (hidroximetil) amino-metano) (Oliver y Chalkley, 1972; Artman y Roth, 1971). La agitación en frío de la suspensión y en ocasiones también el tratamiento con ultrasonidos (Loewus, 1968), conduce a la rotura de la membrana nuclear dando lugar a un gel viscoso y transparente de cromatina, el cual se somete a varios lavados con disoluciones salinas diluídas y con tampón Tris con objeto de eliminar restos de membranas y componentes solubles de los núcleos.

Estos métodos conducen a preparaciones muy puras, pero tienen el inconveniente de su bajo rendimiento y de la pérdida de constituyentes de bajo peso molecular. En el caso concreto de núcleos de insectos, su aislamiento encierra grandes dificultades debido a la presencia de estructuras quitinosas que en el estadio de adulto farato constituyen además su envoltura externa. En los estados de larva y adulto se consiguen preparaciones bastante puras (Oliver y Chalkley, 1972), pero no se ha descrito ningún método para embrión y adulto farato, probablemente debido a que los intentos para conseguir buenas preparaciones no han dado resultados satisfactorios por las peculiaridades de estos materiales con envolturas externas rígidas.

La cromatina también puede prepararse directamente utilizando medios de homogeneización hipotónicos, con lo que la envoltura nuclear se rompe en esta primera etapa. Cuando las condiciones de homogeneización han conducido a la rotura de los núcleos, la cromatina es el componente que sedimenta más rápidamente. En muchos casos la preparación resulta muy contaminada aunque se hayan efectuado sucesivos lavados, y para su purificación se requieren tratamientos especiales como centrifugación en gradiente de densidad o cromatografía en gel. Se habla entonces de cromatina cruda, cromatina purificada, cromatina soluble, etc., atendiendo al grado de pureza y método de preparación.

Para la preparación de cromatina cruda, el material biológico se homogeneiza en soluciones salinas diluidas que habitualmente contienen EDTA (ácido etilendiaminotetracético), citrato trisódico o tampón Tris, pH 6-8.0 (Hnilica y Busch, 1963; Dick y Johns, 1969 a; Zubay y Doty, 1959). El agente complejante EDTA, además de inhibir enzimas por captación de cationes indispensables para su actividad, ayuda a eliminar mucha proteína no-histona (Johns y Forrester, 1969 a), pero, sin embargo, la estructura y actividad de la cromatina depende en gran parte de la naturaleza y concentración de los cationes divalentes presentes, por lo que la presencia de EDTA puede modificar las interacciones histona-DNA (Allfrey, 1970).

Es recomendable también, la adición al medio de homogeneización o de lavado, de octanol para impedir la formación de espuma, de agentes reductores como el bisulfito y sustancias inhibidoras de la proteólisis como el fluorofosfato de diisopropilo (Panyim y Chalkley, 1969 b; Nooden y col., 1973). El homogeneizado se filtra y centrifuga a bajo campo centrífugo para impedir la sedimentación de componentes citoplasmáticos. El sedimento se lava varias veces, bien con el medio de homogeneización, bien con NaCl 0.14M, hasta obtener un sobrenadante incoloro y claro. El sedimento final constituye la cromatina cruda.

En el caso de que la preparación de cromatina se destine exclusivamente al aislamiento de histonas, algunos autores recomiendan también, lavados con tampón Tris, pH 7.0, para eliminar proteínas ribosomales (Hnilica, 1967) y lavados con NaCl 0.25M para eliminar otras proteínas (Johns y Forrester, 1969 a). Estos lavados, aunque mejoran la pureza de la preparación, deben estudiarse cuidadosamente para evitar pérdidas de algunas fracciones de histonas que comienzan a extraerse con concentraciones de NaCl relativamente bajas (Georgiev y col., 1966; Ohlenbusch y col., 1967).



La composición de los preparados de cromatina cruda depende mucho del material biológico de partida. En general, contiene gran cantidad de proteína no-histona y RNA. A pesar de ello, la facilidad y rapidez de su aislamiento, así como el gran rendimiento obtenido, la convierten en el material idóneo para los procesos de fraccionamiento, así como para la obtención y purificación de las histonas y sus fracciones, que requieren suficiente material de partida.

### 1.2.2. AISLAMIENTO DE HISTONA TOTAL

Para el aislamiento de la histona total a partir de la cromatina parcialmente purificada, existen dos procedimientos fundamentales. Las histonas pueden extraerse usando disoluciones ácidas que insolubilizan los ácidos nucleicos y las proteínas no-histonas, o bien el complejo de la DNP (desoxirribonucleoproteína) puede disociarse y solubilizarse usando altas concentraciones salinas, con lo que el DNA y la histona pueden separarse posteriormente.

#### 1.2.2.1. Extracción ácida

La extracción ácida presenta la ventaja de que los ácidos nucleicos de alto peso molecular resultan insolubilizados con este tratamiento y pueden ser separados fácilmente por centrifugación o filtración, y la histona recogida del extracto clarificado se puede precipitar usando acetona o etanol. Si se utiliza HCl 0.2 ó 0.25N para la extracción, las histonas pueden obtenerse por adición de, al menos, 6 volúmenes de acetona; si se usa H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 ó 0.25N, entonces de 2 a 3 volúmenes de etanol son suficientes debido a que los sulfatos de histona son mucho menos solubles en disolventes orgánicos que los hidroccloruros. No existe ninguna evidencia de desnaturalización o formación de estructura  $\beta$  por el uso de disolventes orgánicos para precipitar histonas, y este método

de obtención es más recomendable que la liofilización o la precipitación isoeléctrica.

El precipitado fibroso que a menudo se obtiene al tratar la cromatina con ácido, es probable que mantenga histonas ocluidas, lo que hace la extracción mas difícil; en la práctica es necesario someter a la DNP a 2 ó 3 tratamientos con ácido mediante agitación con bolas, con el fin de conseguir una extracción completa.

Un pequeño inconveniente al uso de la extracción con ácido sulfúrico ha sido señalado por Murray y Milstein (1967); durante alguna hidrólisis ácida posterior, pueden formarse los sulfatos de O-serina y O-treonina, conduciendo a errores en los análisis de aminoácidos. El método de la extracción ácida presenta, sin embargo, otras ventajas, como el hecho de que inhiben la actuación de los enzimas proteolíticos (Phillips y Johns, 1959) e impide la agregación de las histonas. La degradación por ácido no se produce si las extracciones son llevadas a cabo a temperaturas igual o inferiores a 4°C; cualquier degradación de este tipo sería fácilmente detectada por medio del análisis del residuo N-terminal.

#### 1.2.2.2. Disociación salina

El método de disociación salina se basa en un aumento de la concentración de la sal, normalmente NaCl, hasta un valor final de aproximadamente 2M, lo que causa la solubilidad del DNA y de la histona. La concentración requerida para la máxima disociación es variable y depende de la sal utilizada (Ohlenbusch y col., 1967) y del material biológico de partida. Algunos autores utilizan, además del NaCl, concentraciones moderadas de urea -5M- que ayudan a solubilizar los componentes individuales al reducir la agregación (Gilmour y Paul, 1969; Shaw y Huang, 1970; van den Broek y col., 1973). También se han descrito métodos semejantes utilizando cloruro de guanidinio (Arnold y Young, 1972; Levy y col., 1972).

Para la posterior separación del DNA y la histona existen varios procedimientos. El DNA puede precipitarse del complejo disociado por adición de un volumen de etanol. También la adición de HCl ó  $H_2SO_4$  hasta una concentración final de 0.25N conduce a la precipitación de ácidos nucleicos y proteínas ácidas. Las histonas se obtienen del sobrenadante, previa diálisis para eliminar el NaCl, por adición de acetona o etanol. La desventaja de este método es que siempre precipita algo de histona con el DNA, lo que hace necesario varias redisociaciones en sal concentrada para la obtención completa de la histona.

Bauer y Johanson (1966) demostraron la posibilidad de separar el DNA y la histona por ultracentrifugación a 200.000 g durante 8 horas. Este método presenta la ventaja de que puede aplicarse a muestras muy pequeñas de tejido.

También se ha conseguido (Loeb, 1968) una buena separación de DNA e histonas mediante cromatografía sobre Sepharose 4B. Como la ultracentrifugación descrita antes, esta separación es muy útil para pequeñas cantidades de material, aunque resultan prácticamente difíciles separaciones a gran escala basadas en estos métodos. Tanto la ultracentrifugación como la cromatografía en gel presentan el inconveniente de no separar la histona de la proteína no-histona. Esta última puede eliminarse por adición de ácidos diluidos que la insolubilizan, o puede separarse por cromatografía de cambio de ión (Levy y col., 1972; van den Broek y col., 1973).

El principal inconveniente del método de disociación salina es que las histonas tienden a agregar a valores de pH superiores a 4.0 (Davison y Shooter, 1956; Johns, 1968), y esto puede interferir seriamente con cualquier procedimiento de fraccionamiento posterior. Además, varias proteínas ácidas nucleares que normalmente no se eliminan por lavados con disoluciones salinas, y que no se extraen con ácidos, pueden solubilizarse en estas condiciones (Wang, 1967), y pueden ser aisladas junto con las histonas.

### 1.2.3. AISLAMIENTO DE FRACCIONES

#### 1.2.3.1. Fraccionamiento de histona total

##### Cromatografía de cambio de ión.

Los dos métodos más extendidos utilizan Amberlita IRC 50 y carboximetilcelulosa como resinas cambiadoras de iones. Luck y col., (1958), demostraron que la histona total podía ser eluida de IRC 50 usando un gradiente de cloruro de guanidinio a pH 6.8. Se obtenían cuatro picos principales que fueron designados como I, II, III y IV. Rasmussen y col., (1962) y Murray (1964) ampliaron este trabajo y obtuvieron perfiles de elución bastante mas complicados. Aparte de la fracción I (F1), una histona rica en lisina, los otros picos son complejos, probablemente debido a agregación a este pH, muy próximo a la neutralidad. Aunque este procedimiento no es satisfactorio para el fraccionamiento de la histona total en sus principales componentes, ha sido utilizado con éxito para procesos de purificación y subfraccionamiento (Kinkade y Cole, 1966 a).

Johns y col., (1960) consiguieron fraccionar la histona total en tres componentes principales, designados F1, F2 y F3, utilizando una columna de CMC y efectuando una elución por etapas con tampón pH 4.2 seguido por disoluciones diluidas de HCl. Posteriormente se demostró que F1 es una histona rica en lisina, F2 es una mezcla, y F3 es una histona rica en arginina. Este método tampoco es adecuado para el fraccionamiento completo de la histona total; hoy en día constituye una técnica auxiliar de fraccionamiento, en combinación con métodos químicos.

##### Cromatografía en gel.

Cruft (1961) demostró que la histona total podía ser parcialmente fraccionada usando Sephadex G-75 y eluyendo con HCl 0.02N. La histona  $\alpha$ , rica en lisina (F1) fue la primera en eluir;

no se obtuvo ninguna otra fracción bien definida. Resultados semejantes se han obtenido con Biogel P-60 (Hamana e Iwai, 1971).

Recientemente se ha descrito el fraccionamiento de la histona total de timo de ternera mediante cromatografía de exclusión (Böhm y col., 1973). Los mismos autores (van der Westhuyzen y col., 1974) han conseguido aislar las seis fracciones de histonas de eritrocito de pollo mediante una combinación de cromatografías en gel -Biogel P-60 y Sephadex G-100- utilizando unas condiciones específicas de pH y fuerza iónica.

#### Distribución en contracorriente.

Esta técnica ha sido aplicada al fraccionamiento de histonas totales por Butler y col., (1967). Se obtuvieron tres fracciones, pero las separaciones no se consideraron lo suficientemente satisfactorias como para su utilización posterior.

#### Técnicas de precipitación.

Se han intentado precipitaciones diferenciales usando una gran variedad de reactivos: acetona, etanol, ácido tricloroacético, ácido perclórico. La histona F1, rica en lisina, puede aislarse fácilmente de la histona total por varios de estos procedimientos, pero las demás fracciones no se resuelven totalmente.

#### 1.2.3.2. Extracción selectiva

##### Disociación selectiva con sales.

Ohlenbusch y col., (1967) han realizado un extenso estudio sobre la selectividad de la disociación de DNP de timo de ternera utilizando cloruro sódico. En presencia de NaCl 0.3M, las histonas permanecen unidas al DNA, solubilizándose la mayor parte de la proteína no-histona (Johns y Forrester, 1969 a). La fracción I (F1), la histona rica en lisina, puede separarse de la DNP, se--

lectivamente, usando NaCl 0.4-0.5M. Cuando la concentración de sal supera este valor sólo se separan mezclas de las restantes fracciones, siendo las histonas ricas en arginina las que se separan a mayores concentraciones -1.6M-. Resultados similares fueron obtenidos por Georgiev y col., (1966). Ohlenbusch y col., (1967) también demostraron que usando perclorato sódico, la disociación de DNP se produce aproximadamente a la mitad de la molaridad requerida con cloruro sódico, y Johns y Forrester (1969 b) han separado selectivamente la fracción F1 por extracción de la DNP con cloruro magnésico 0.1M. Smart y Bonner (1971) han estudiado los efectos disociantes del desoxicolato sódico, encontrando que este agente es 20 veces mas activo que el NaCl o el cloruro de guanidinio y 10 veces mas activo que el perclorato sódico. Estos hechos les llevaron a concluir que la efectividad disociadora de una sal es función de la interacción del anión con sitios específicos de la proteína, mas bien que de la interacción del catión con los restos fosfatos del DNA.

La disociación de la DNP de eritrocitos de pollo, que contiene la fracción de histona designada como V (Vidali y Neelin, 1968) o F2C (Hnilica, 1964), ha sido estudiada por Wilhelm y Champagne (1969). Estos autores han encontrado que la fracción F1 se separa selectivamente usando NaCl 0.4-0.5M, como sucede en timo de ternera, y que con concentraciones mas altas, 0.6-0.7M, se extrae la fracción F2C. Por encima de 0.7M ya no existe ninguna selectividad en la disociación.

#### Extracción selectiva con ácidos.

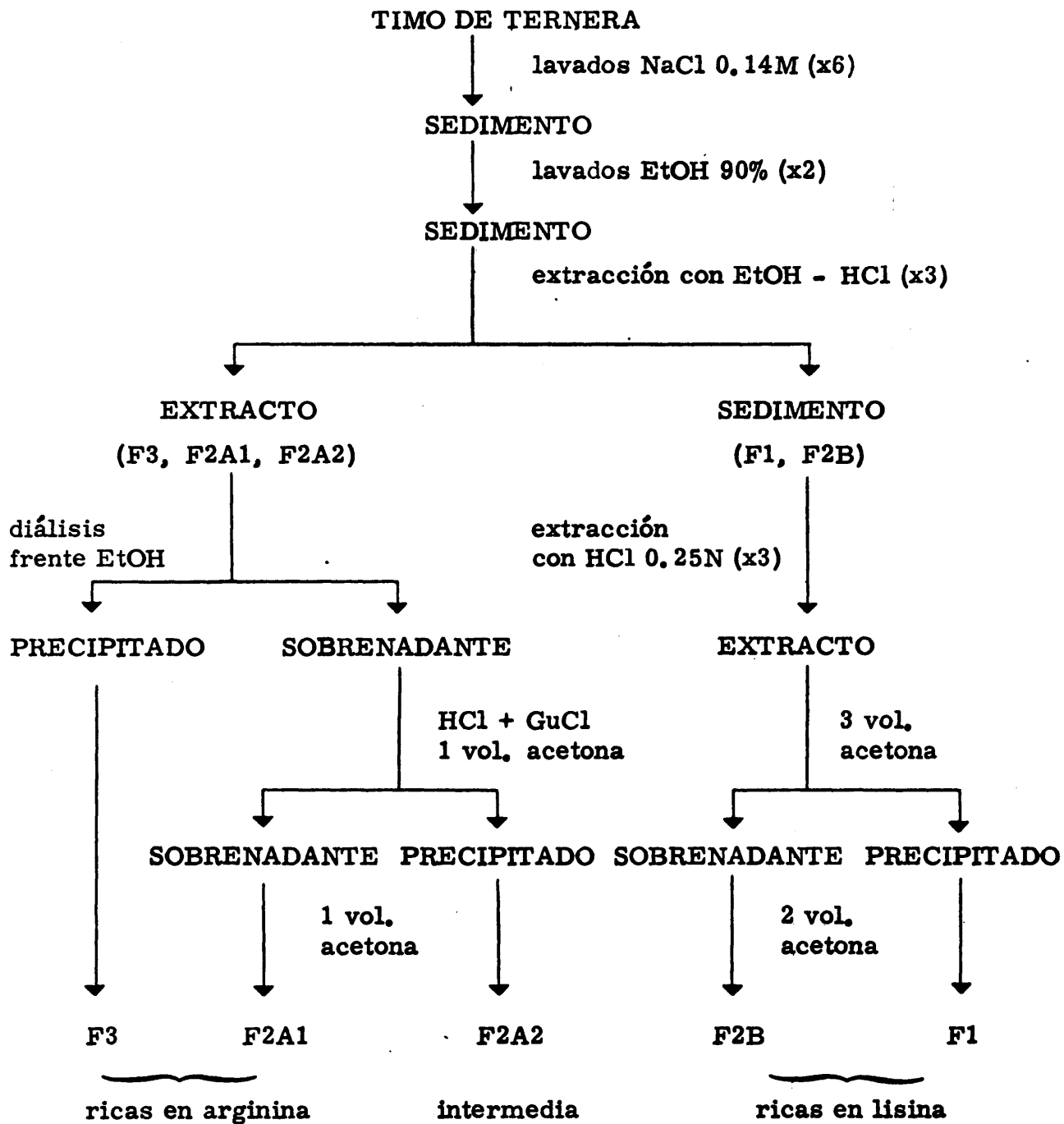
Murray, en un estudio exhaustivo de las posibilidades de extracción selectiva con ácidos, ha demostrado que la única fracción que puede ser separada selectivamente de la DNP de timo de ternera, en una forma relativamente pura, es la fracción F1. Las demás se separan en grupos, y la situación se asemeja a los experimentos de disociación salina (Murray, 1966). Este mismo autor

en un estudio similar con DNP de eritrocito de pollo, ha logrado aislar, en forma pura, las fracciones F1 y F2C, gracias a un riguroso control del pH de las soluciones de extracción (Murray y col. 1968).

Se han descrito otros métodos para la extracción selectiva de F1, usando ácido cítrico (Davison y Butler, 1954), ácido tricloroacético (Denooij y Westenbrink, 1962) y ácido perclórico (Johns y Butler, 1962 a). La extracción con ácido perclórico al 5% es la más utilizada y ha permitido el aislamiento de la fracción muy rica en lisina en una gran variedad de organismos.

#### Extracción selectiva usando disolventes orgánicos.

Ya se ha señalado como, con el uso exclusivo de sales o de ácidos, sólo es posible obtener una selectividad limitada en la extracción, y que la primera fracción que se separa es, invariablemente, la F1. No es sorprendente ya que parece ser la fracción menos firmemente unida al DNA (Johns y Butler, 1964) y estos reactivos no hacen sino inestabilizar enlaces iónicos. Sin embargo, mezclando disolventes orgánicos con la disolución de extracción, es posible aprovechar también las diferentes polaridades relativas de las fracciones de histonas (Butler y col., 1968; Hatch, 1965). Usando una mezcla de etanol y HCl, las fracciones F3, F2A1 y F2A2 pueden separarse de la DNP de timo de ternera, selectiva y cuantitativamente, quedando unida al DNA F1 y F2B, que pueden ser extraídas a continuación con HCl 0.25N (Johns, 1964 a). Estos grupos pueden ser subdivididos fácilmente mediante métodos de precipitación selectiva con disolventes orgánicos, logrando así las fracciones individuales. Esta extracción selectiva con etanol-HCl es la base de un método que permite el aislamiento de las cinco fracciones en grandes cantidades y en una misma operación (Johns, 1964 a, 1967 b, 1969 b). En la Figura 1 se representa un esquema general del fraccionamiento completo.



**Figura 1.** Método para la preparación de las cinco fracciones principales de histonas de timo de ternera (Johns, 1971)



De forma semejante puede obtenerse una extracción selectiva de F2A1 y F2A2 usando una mezcla de cloruro de guanidinio (o cloruro sódico) y etanol, y esto ha facilitado el desarrollo de un método para la preparación en gran escala de estas fracciones (Johns, 1967 b). Esta extracción presenta la ventaja de realizarse a pH neutro, con lo que la nucleoproteína parcialmente deshistonizada que resulta puede, todavía, actuar como "template" para la síntesis de RNA, e incluso someterse a estudios conformacionales.

Estos procedimientos son aplicables, en teoría, a toda clase de materiales biológicos, siempre que se utilice nucleoproteína razonablemente pura como material inicial, y se ajuste la escala de la preparación de acuerdo con el contenido en histona (o DNA). Sin embargo, en la práctica y a pesar de estas precauciones, estos métodos no han dado resultados tan satisfactorios como en timo de ternera (Dick y Johns, 1969), por lo que es difícil conseguir buenos resultados de pureza y rendimiento de las cinco fracciones de histonas en un sólo proceso y se ha de recurrir a la aplicación de métodos específicos distintos o a la combinación de los descritos a fin de aislar las distintas fracciones a partir de un determinado material biológico.

#### 1.2.4. PURIFICACION, SUBFRACCIONAMIENTO Y HETEROGENEIDAD

Las fracciones de histonas aisladas por los métodos de fraccionamiento anteriormente descritos suelen estar impurificadas por pequeñas cantidades de otras fracciones o por proteína extracromosomal. La contaminación por parte de proteínas ácidas se elimina fácilmente por cromatografía de cambio de ión (Johns, 1964 a; Buckingham y Stocken, 1970). La cromatografía en gel se utiliza en la eliminación de sustancias originadas por degradación o agregación de histonas. Por último, la contaminación debida a otras fracciones se evita a base de reciclaciones del método de fraccionamiento empleado.

La heterogeneidad de las fracciones de histonas ha sido muy discutida, y son muchos los trabajos que hacen referencia a la existencia de gran número de componentes en ellas (Neelin y Neelin, 1960; Mauritzen y col., 1967). Gran parte de esta heterogeneidad puede estar causada por la agregación de las fracciones entre si (Hnilica y Bess, 1965; Fambrough y Bonner, 1968), degradación de las mismas, o contaminación por proteína no-histona. Actualmente, al contar con técnicas adecuadas de aislamiento y caracterización, se ha detectado la heterogeneidad real de las histonas, que puede deberse a pequeñas diferencias en la estructura primaria, como es el caso de la histona rica en lisina F1, o a modificaciones covalentes de las cadenas laterales de los aminoácidos que ocurren en todas las fracciones de histonas.

La heterogeneidad de la histona F1 se ha detectado por cromatografía en CMC (Johns y col., 1960) o en Amberlita IRC 50 (Rasmussen y col., 1962), y por estudios combinados de cromatografía y precipitación con acetona (Johns, 1964 a, 1964 b). Su subfraccionamiento fue conseguido por Kinkade y Cole (1966 a), quienes obtuvieron tres subfracciones por cromatografía en Amberlita IRC 50 y elución con gradiente de cloruro de guanidinio; este método de separación, que tiene lugar a pH 6.8, es extramadamente sensible ya que posteriormente se ha demostrado que las subfracciones poseen estructuras primarias muy semejantes (Kinkade y Cole, 1966 b). La significación de estas pequeñas diferencias no se conoce por el momento, pero las subfracciones parecen ser específicas de especie (Bustin y Cole, 1968; Kinkade, 1969).

El resto de las fracciones de histonas se comportan de modo muy similar entre ellas, y las técnicas cromatográficas no son capaces de subfraccionarlas. Solamente la aplicación de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en tubos de gran longitud ha puesto de manifiesto la microheterogeneidad de estas fracciones originada por modificación covalente. La resolución alcanzada por este método es tal que puede detectarse el cambio de mo

validad electroforética sufrido por una histona cuando la carga efectiva de la molécula resulta disminuida por una única acetilación o fosforilación (Panyim y Chalkley, 1969 b; Balhorn y col., 1972 a). Recientemente, Dixon y sus colaboradores (Louie y Dixon, 1972; Candido y Dixon, 1972) han utilizado una modificación de electroforesis en gel de almidón con la que se resuelve los derivados acetilados y/o fosforilados de histonas, de las fracciones no modificadas. Tales técnicas han hecho posible el análisis detallado de las cantidades relativas de varias subfracciones de histonas presentes en distintos tejidos, así como la investigación de relaciones, en el tiempo, entre el metabolismo de histonas y otros acontecimientos celulares (Balhorn y col., 1972 b; Oliver y col., 1972; Louie y Dixon, 1972; Candido y Dixon, 1972).

Como resultado de todos estos estudios, parece seguro concluir que la fracción F1 es la única que presenta una heterogeneidad debida a pequeñas diferencias en la estructura primaria. El resto de la fracciones son todas homogéneas, constituidas por una única cadena proteica susceptible de modificaciones covalentes que hacen variar su carga eléctrica. Estos resultados han sido confirmados al ser dilucidadas las secuencias de estas fracciones (ver apartado 1.4.2.).

### 1.3. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE HISTONAS

=====

Las histonas se han caracterizado principalmente por análisis de aminoácidos, incluyendo determinación de los residuos N- y C-terminales, y por electroforesis en gel de almidón y poliacrilamida. Cada una de las cinco fracciones principales tiene sus propias características por las que puede ser reconocida, lo que hace posible detectar específicamente una determinada fracción en una mezcla de histonas (Johns, 1968 b).

### 1.3.1. ELECTROFORESIS EN GEL

Se han usado muchos métodos para la electroforesis de histonas en diferentes medios estabilizantes. La electroforesis en gel de almidón, introducida por Smithies (1955), fue utilizada con éxito por Neelin y Connell (1959) para resolver las histonas de eritrocito de pollo; posteriormente Johns y col., (1961) desarrollaron un método a bajo pH -2.4- para la separación de histonas de timo de ternera. Sin embargo, actualmente se consiguen separaciones mucho mejores, utilizando gel de poliacrilamida, fácil de preparar y manejar, por lo que se usa universalmente.

La separación de las proteínas por electroforesis de disco depende de sus diferencias en carga y tamaño. La resolución es muy alta debido a la inicial concentración de la muestra en una banda estrecha y a la virtual ausencia de fenómenos de adsorción en los geles. En la imagen electroforética se observa un conjunto de bandas coloreadas que corresponden a componentes que difieren en carga, en peso molecular o en ambas. Estas bandas pueden agruparse en tres zonas bien definidas: una superior en la que se encuentran las sustancias de baja movilidad -proteínas no-histonas de carácter ácido o neutro que a bajo pH tiene carga ligeramente positiva por lo que migran poco, y agregados de histonas de alto peso molecular-, una zona intermedia donde se localizan las fracciones de histona, y una tercera zona, inferior, donde se encuentran los componentes de bajo peso molecular y mayor movilidad, generalmente productos proteolíticos de las fracciones.

Las aplicaciones de la electroforesis en gel de poliacrilamida son múltiples: control de pureza, identificación y caracterización, valoraciones cualitativas y cuantitativas, estudios comparativos, etc.

La técnica es insustituible como método de control de pureza; la presencia de banda de alta o baja movilidad es indicio

claro de contaminaciones o degradaciones. Igualmente es técnica auxiliar imprescindible para valorar los resultados de los fraccionamientos.

La identificación y caracterización de fracciones requiere la comparación de movilidades electroforéticas. Para ello es muy útil emplear la técnica de electroforesis doble (Johns, 1969 a) en la que tanto la muestra en estudio como la patrón se aplican sobre la superficie del mismo gel, aunque sin mezclarse, con lo que migran una junto a otra. Así cualquier variable afectaría a la movilidad de ambas muestras y se evitaría cualquier error. Las histonas totales de timo de ternera que han sido fraccionadas y caracterizadas profundamente pueden usarse como patrón de comparación.

También puede utilizarse como criterio de identificación la distinta coloración que determinadas fracciones dan con algunos colorantes (Cohen y Gotchel, 1971; Panyim y col., 1971; Barrett y Johns, 1974).

La determinación cuantitativa de las fracciones de histonas puede realizarse por colorimetría de las bandas, bien registrando la densidad óptica a lo largo del gel (Fambrough y col., 1968; Panyim y Chalkley, 1969 b; Mazen y Champagne, 1972), o seccionando las bandas coloreadas y extrayendo el colorante de cada una de ellas (Johns, 1967 a). La exactitud de estos métodos depende de la extractibilidad de las histonas, que ha de ser cuantitativa, y del conocimiento del rendimiento de la tinción.

### 1.3.2. COMPOSICION DE AMINOACIDOS

Las histonas son proteínas básicas, sólo superadas en basicidad por las protaminas. Las altas proporciones en que se encuentran algunos aminoácidos las diferencian claramente de otras proteínas. Así, el contenido en arginina de las fracciones F2A1 y F3 es aproximadamente igual al 13%. La alta proporción de lisina en la fracción F1 no es superada por ninguna proteína. Otras características destacables son el alto contenido en glicocola de la fracción F2A1, un 15%, y el contenido en leucina de la F2A2, aproximadamente un 13%.

Aparte de las propiedades señaladas, existen características únicas que permiten distinguir unas histonas de otras. Así, la fracción muy rica en lisina, F1, se distingue por su alto contenido en lisina, alanina y prolina, y por la ausencia de histidina. La fracción rica en lisina, F2B, se caracteriza por su alto contenido en serina y por ser la única fracción que presenta prolina en su extremo N-terminal. La fracción intermedia F2A2 sólo tiene una característica sobresaliente: la alta proporción de leucina en su composición. La fracción rica en arginina F2A1 se distingue por su alto contenido en glicocola y tiene este mismo aminoácido como residuo C-terminal. La fracción F3, rica en arginina, posee cisteína y presenta alanina como residuo N- y C-terminal. También pueden ser útiles algunos datos derivados del análisis de aminoácidos, como la relación de lisina a arginina o la de aminoácidos básicos a ácidos.

Todos estos datos están basados en el estudio de las histonas de timo de ternera, aunque, en líneas generales, las características de composición de aminoácidos se dan, semejantes, en otros organismos. En la Tabla II se presentan los análisis de aminoácidos, residuos terminales y datos derivados, de las cinco fracciones principales de timo de ternera. Los datos proceden de fracciones obtenidas por los métodos preparativos discutidos anteriormente

T A B L A   I I

Composición de aminoácidos y datos derivados de las cinco fracciones principales de histona de timo de ternera.

Aminoácido	F1	F2B	F2A2	F2A1	F3
Acido aspártico	2.2	4.8	6.2	4.9	3.7
Treonina	5.7	6.4	3.9	6.9	7.4
Serina	5.8	11.2	3.1	2.0	3.7
Acido glutámico	3.1	8.0	9.3	5.9	11.1
Prolina	8.9	4.8	3.9	1.0	4.4
Glicocola	7.0	5.6	10.9	16.7	5.2
Alanina	25.1	10.4	13.2	6.9	13.3
Cisteína	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
Valina	5.0	7.2	6.2	8.8	4.4
Metionina	0.0	1.6	0.0	1.0	1.5
Isoleucina	0.7	4.8	4.6	5.9	5.2
Leucina	4.6	4.8	12.4	7.8	8.9
Tirosina	0.5	4.0	2.3	3.9	2.2
Fenilalanina	0.6	1.6	0.8	2.0	3.0
Histidina	0.0	2.4	3.1	2.0	1.5
Lisina	29.4	16.0	10.9	10.8	9.6
Arginina	1.4	6.4	9.3	13.7	13.3
Amidas	-	7	11	4	9
B/A	5.8	1.9	1.5	2.5	1.6
Lys/Arg	21.0	2.5	1.2	0.8	0.7
N-terminal	Ac-	Pro	Ac-Ser	Ac-Ser	Ala
C-terminal	Lys	Lys	Lys	Gly	Ala
Nº residuos	218	125	129	102	135

La composición se da en moles por ciento. Los datos de las fracciones F2B, F2A2, F2A1 y F3 se han calculado a partir de sus secuencias de aminoácidos. Referencias como en Tabla I.

(Johns, 1964 a, 1967 b; Phillips y Johns, 1965), y se comparan con los análisis calculados a partir de los trabajos de secuencia, en aquellos casos en que la estructura primaria es conocida.

### 1.3.3. OTROS METODOS

El análisis de aminoácidos y la electroforesis en gel son suficientes para caracterizar cualquier mezcla de histonas. Además de estos métodos generales existen otros que aprovechan propiedades particulares de las fracciones y por ello tienen una utilización limitada.

La histona rica en lisina, F1, es soluble en ácido perclórico al 5% (Johns y Butler, 1962 a) y ácido tricloroacético al 5% (Denooij y Westenbrink, 1962), mientras que las otras cuatro fracciones precipitan con estos reactivos. El DNA disuelto en NaCl 0.5M se recombina y precipita con todas las otras fracciones, pero no con la F1 (Johns, 1971).

La histona F2A1, rica en arginina, agrega a concentraciones muy bajas de ácido tricloroacético -0.01N- y puede reconocerse así en una mezcla de histonas (Johns, 1968 b).

La otra fracción rica en arginina, la histona F3, a causa de la presencia de cisteína en su composición, puede distinguirse de las demás fracciones por un tipo específico de agregación. A pH 7.0 forma polímeros (dímeros, trímeros, etc.) debido, presumiblemente, a la oxidación de la cisteína para originar puentes disulfuros intermoleculares, produciendo una multiplicidad de bandas en electroforesis, (Johns, 1968 a; Panyim y col., 1970). También se ha detectado cisteína en la fracción F2A1 de equinodermos (Subirana, 1971).



#### 1.4. ESTUDIOS FISICOS Y CONFORMACIONALES

=====

El establecimiento de las relaciones estructura-función de las histonas necesita de un conocimiento profundo de sus conformaciones y de la distribución espacial que presentan en la nucleohistona. Las investigaciones que se vienen desarrollando sobre este campo, se agrupan en tres líneas principales:

- a) Estudios físicos de las conformaciones de las fracciones de histona purificadas y de su comportamiento conformacional. Los métodos de aislamiento y purificación de que se dispone hoy día permiten que pueda investigarse la estabilidad conformacional de cada histona, en función del disolvente. Además la determinación de las secuencias de aminoácidos de muchas fracciones es de la máxima ayuda para la interpretación de los datos espectroscópicos, sobre todo de los de resonancia magnética nuclear.
- b) Estudios espectroscópicos y de difracción de rayos X de nucleohistona nativa y de DNP parcialmente deshistonizada, resultado de extraer selectivamente algunas de las fracciones. Se persigue con esto, obtener información sobre la conformación de la histona y del DNA en el complejo de nucleohistona, y sobre sus relaciones espaciales.
- c) La tercera línea está centrada en estudios físicos de nucleoproteínas reconstituídas a partir de DNA y cada una de las fracciones de histonas. Se trata así de averiguar en qué medida contribuye cada una de las histonas a la estructura de la nucleohistona.

#### 1.4.1. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

Muchos de los estudios de las propiedades físicas y químicas de las histonas han proporcionado valiosos datos para el conocimiento de la posible relación estructura-función de estas proteínas. Pero además, estas investigaciones son a menudo de interés general, puesto que las propiedades moleculares de las histonas son muy diferentes de las de otras proteínas globulares comúnmente estudiadas.

Varios ejemplos interesantes de este comportamiento aparentemente anómalo de las histonas se pueden encontrar en los intentos de la estimación de su peso molecular.

La técnica de ultracentrifugación se encuentra con los graves problemas de la autoasociación, y de la gran influencia que la concentración de histona ejerce sobre los coeficientes de sedimentación, especialmente a baja fuerza iónica (Edwards y Shooter, 1969); esto dificulta la exacta estimación de los pesos moleculares de las histonas. Los intentos de superar los efectos de carga y agregación usando altas concentraciones de cloruro de guanidinio como disolvente, pueden introducir problemas adicionales de no-idealidad (Munk y Cox, 1972).

La cromatografía por filtración en gel, otro popular método para la rápida determinación de pesos moleculares, tampoco produce buenos resultados con histonas (Phillips y Clarke, 1970). Las histonas se cromatografían normalmente en ácido diluido -HCl 0.01N- para reducir su tendencia a la agregación, y a este pH toman una conformación muy extendida, posiblemente como resultado de la repulsión de cargas. Así, su radio de Stokes efectivo, la propiedad que realmente se mide por cromatografía en gel, es anormalmente grande cuando se compara con el de proteínas menos cargadas y de peso molecular parecido; el resultado es una sobre-estimación del peso molecular. Una segunda fuente de error es la ten-

dencia que presentan las histonas a quedar retenidas en las cargas residuales de la matriz del gel (Chen y Craig, 1972; Candido y Dixon, 1972). El resultado de este efecto es el retraso en la elución de la histona, lo que lleva a sub-estimar su tamaño molecular.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) es quizá el método más utilizado para una rápida estimación del peso molecular. Shapiro y col., (1967) y Weber y Osborn (1969) demostraron que la movilidad electroforética de todas las proteínas probadas es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Si se comparan las movilidades relativas de las diferentes histonas con las de proteínas globulares (Panyim y Chalkley, 1971), resultan unos pesos moleculares aparentes para las histonas considerablemente superiores a los establecidos por estudios de secuencia de aminoácidos (DeLange y col., 1969, 1972; Iwai y col., 1970), o por otros métodos (Teller y col., 1965). Parece probable que esta aparente discrepancia resulte de una reducción significativa de carácter aniónico de los complejos histona-SDS, a causa del número anormalmente grande de cargas positivas en la histona. También, es posible que la parcial neutralización de las cargas negativas del SDS lleve a una conformación del complejo histona-SDS menos extendida que la de los complejos proteína ácida-SDS, lo que tendería a contrarrestar la reducción en movilidad debida a la reducción de carga. Sin embargo, esto parece improbable a la vista de los estudios hidrodinámicos de Reynolds y Tanford (1970) que no revelan ningún comportamiento anómalo de los complejos histona Fl-SDS.

Todo lo anteriormente expuesto viene a resaltar las especiales propiedades moleculares de las histonas y, particularmente, las dificultades existentes en la estimación de sus pesos moleculares. Hoy en día, los trabajos de secuencia han conducido al conocimiento del peso molecular exacto de varias fracciones de histonas de timo de ternera, lo que ha permitido (Panyim y Chalkley 1971) utilizar esas fracciones como patrones en la electroforesis

en SDS. La curva estándar construida con los logaritmos de los pesos moleculares en función de las movilidades relativas, aunque conserva la linealidad, difiere en la pendiente y en la intersección con el eje de abscisas cuando se compara con la obtenida con proteínas globulares.

Así pues, la electroforesis en SDS permite la estimación del peso molecular de histonas, siempre que se utilicen como patrones fracciones de histonas de peso molecular conocido. En cualquier caso la técnica no es muy sensible, y los datos que proporciona sólo son aproximados; el error en la determinación de los pesos moleculares puede llegar a ser del orden del 10% (Wigle y Dixon, 1971).

Los datos de pesos moleculares de las fracciones principales de histonas se recogen en la Tabla I.

#### 1.4.2. RELACIONES ENTRE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE HISTONAS Y SUS POSIBLES CONFORMACIONES

La determinación de la secuencia de aminoácidos de histonas ha sido el objetivo de varios grupos de investigación en los últimos años. El resultado ha sido el conocimiento de la estructura primaria de cuatro de las fracciones principales de histonas, encontrándose la secuencia de las dos restantes -F1 y F2C- en un avanzado estado de elucidación.

La primera histona totalmente secuenciada fue la F2A1 de timo de ternera (DeLange y col., 1968, 1969 a; Ogawa y col., 1969), inmediatamente seguida por las F2A1 de embrión de guisante (DeLange y col., 1969 b), hepatoma de rata (Wilson y col., 1970), timo de cerdo (Sautiere y col., 1970, 1971 b), tumor cloroleucémico de rata (Sautiere y col., 1971 a) y, recientemente, F2A1 del erizo Parechinus angulosus (Strickland y col., 1974).

La estructura primaria de la histona F3 se conoce en timo de ternera (DeLange y col., 1972), eritrocito de pollo (Brandt 1972), testículo de carpa (Hooper y col., 1973), embrión de guisante (Patthy y col., 1973) y eritrocito de tiburón (Brandt y col., 1974).

La fracción rica en lisina, F2B, de timo de ternera fue secuenciada por Iwai y col. (1970). Aunque por el momento no se conoce la estructura primaria de esta histona procedente de otros organismos, el estudio de mapas peptídicos (Hnilica, 1967) ha permitido desarrollar estudios comparativos.

Yeoman y col. (1972) y Sautiere y col., (1972) han determinado la secuencia completa de la histona F2A2 de timo de ternera. Posteriormente Bailey y Dixon (1973) dilucidaron la estructura primaria de la misma fracción de testículo de trucha.

La histona muy rica en lisina, F1, es la mayor de todas las fracciones (218 residuos). Su secuencia completa no se conoce por el momento, aunque se han desarrollado estudios de fragmentación, composición de aminoácidos en péptidos e incluso determinación de secuencias parciales (Bustin y col., 1969; Evans y col., 1970; Rall y Cole, 1971). Se ha determinado la secuencia de los 108 residuos primeros de esta histona procedente de timo de conejo (Rall y Cole, 1971; Jones y col., 1974

Los intentos para determinar la estructura primaria de la histona F2C, la fracción encontrada en eritrocitos nucleados, no han dado fruto por el momento (Greenaway, 1971; Greenaway y Murray 1971; Garel y col., 1972), aunque se conocen varias secuencias parciales (Garel y col., 1975; Sautiere y col., 1975).

El estudio comparado de estas secuencias de aminoácidos de las fracciones de histonas, parcialmente o totalmente conocidas, revela ciertas características estructurales dignas de ser des

tacadas.

Así, la gran homología existente entre las secuencias de aminoácidos de varias de las fracciones de histona procedentes de diferentes organismos. El caso más claro es el presentado por la histona F2A1. Es francamente notable el hecho de que se hayan dado sólo dos sustituciones conservativas -valina por isoleucina y lisi na por arginina- entre dos organismos tan distantes filogenéticamente como el guisante y la vaca. Ya se ha señalado (DeLange y col., 1969 b) el hecho de que las secuencias del citocromo c procedente de trigo y vaca difieren en casi un tercio de sus residuos de aminoácidos, y sin embargo ejercen la misma función en ambos organismos. Por comparación, las relaciones estructura-función inherentes a la actividad biológica de la histona F2A1, deben ser extremadamente exigentes, es decir, un cambio muy leve en la estructura primaria de la proteína puede afectar radicalmente su función. La otra fracción rica en arginina, F3, presenta también una alta estabilidad con la evolución, aunque inferior a la F2A1. Es de destacar el hecho de que uno de los cambios sufridos por la histona F3 al pasar de la vaca a la carpa, el tiburón o el guisante, es la sustitución de una cisteína por una serina; la pérdida de un residuo de cisteína en una proteína cuya estructura primaria resulta ser muy estable en el transcurso de la evolución, puede interpretarse como un hecho de alguna trascendencia, ya que provoca un cambio considerable en la capacidad de la molécula para interaccionar con otras proteínas. Se puede argüir que la formación de enlaces covalentes a través de este residuo no es esencial para la función de la histona F3; este postulado viene apoyado por la idea de que este residuo de cisteína puede estar oculto en la estructura terciaria de la proteína (Palau y Padrós, 1972). También se detectó la presencia de cisteína en la fracción F2A1 de equinodermos (Subirana, 1971); recientemente se ha determinado la estructura primaria de la F2A1 de erizo de mar (Strickland y col., 1974), comprobándose que la única diferencia con timo de ternera radica en la aparición de un residuo de cisteína en la posición ocupada por una treonina en timo. El alcance y la

proyección de este cambio en la función biológica de esta histona está todavía sin aclarar.

La homología existente entre las secuencias de aminoácidos de las fracciones muy ricas en lisina, F1, procedentes de distintos organismos es también alta (Rall y Cole, 1971; Johnson y col., 1974), aunque la variabilidad en esta fracción es superior a la encontrada en cualquier otra clase de histona. Por el momento no se poseen muchos datos para determinar la estabilidad evolutiva de las histonas F2B y F2A2.

Una segunda característica estructural de las fracciones de histonas que se descubre al estudiar sus secuencias es la distribución extremadamente irregular de los aminoácidos a lo largo de la cadena peptídica, distribución que afecta, fundamentalmente, a la posibilidad de adquisición de una determinada conformación por parte de la molécula de histona.

En la Tabla III se muestra la distribución de aminoácidos en distintas regiones de la cadena polipeptídica de las cinco fracciones principales de histonas de timo de ternera. También se incluyen las composiciones de aminoácidos de algunas enzimas y proteínas globulares. Claramente se observa como la irregularidad en la distribución de aminoácidos conducen a una "polaridad" en las moléculas de histonas, con una alta densidad de residuos básicos en una porción de la misma.

En el caso de la fracción F2A1, la mitad amino-terminal de la molécula contiene una proporción muy alta de residuos básicos y glicocola. Esta distribución ha llevado a sugerir que la mitad N-terminal de la molécula es el lugar primario de interacción con el DNA (DeLange y col., 1969 a). La mitad carboxilo-terminal presenta una composición semejante a la de las proteínas globulares, con una relación de residuos básicos/ácidos de 1.5:1, a diferencia de 15.6:1 que presenta la mitad amino-terminal; esta mitad

T A B L A   I I I

Distribución de aminoácidos en las cinco fracciones de histona de timo de ternera y en algunas proteínas globulares.

Tipo de aminoácido	F1			F2A2		
	número de residuo			número de residuo		
	1-54	55-108	109-218	1-42	43-92	93-129
Básicos	22.2	18.5	39.1	33.3	14.0	24.3
Acidos	7.4	7.4	1.8	2.4	14.0	2.7
Hidrofóbicos	7.4	25.9	3.6	16.7	32.0	29.7
Prolina	13.0	0	14.5	2.4	4.0	5.4
B/A	3.0	2.5	21.7	13.9	1.0	9.0

Tipo de aminoácido	F2B			F3		F2A1	
	número de residuo			nº residuo		nº residuo	
	1-34	35-79	80-125	1-53	54-135	1-45	46-102
Básicos	44.1	13.3	21.8	34.0	18.3	37.8	17.6
Acidos	2.9	11.1	6.5	1.9	12.2	2.2	10.6
Hidrofóbicos	2.9	37.8	26.1	11.3	34.1	17.8	39.3
Prolina	11.8	2.2	2.2	7.5	2.4	2.2	0
B/A	15.2	1.2	3.4	17.9	1.5	17.2	1.7

Tipo de aminoácido	$\alpha$ -Lactalbúmina	Lisozima	Papaína	Ribonucleasa
Básicos	11.0	13.0	10.0	11.0
Acidos	8.0	8.0	7.0	8.0
Hidrofóbicos	31.0	30.0	26.0	26.5
Prolina	1.7	1.8	5.0	3.0
B/A	1.4	1.6	1.4	1.4

Los valores se dan en moles por ciento. Referencias como en Tabla I.



de la molécula contiene también la mayoría de los residuos hidrofóbicos. Estos hechos conducen a pensar que cualquier estructura secundaria organizada que posea la molécula, y que no venga impuesta por su interacción con el DNA, estará presente, con gran probabilidad, en la mitad carboxilo-terminal de la histona (DeLange y col., 1969 a). Igualmente se supone que esta zona de la molécula será una región destinada a establecer interacciones con otras proteínas.

El resto de las fracciones presentan igualmente una irregular distribución de aminoácidos. Las histonas F2A2, F2B y F3 muestran, como la F2A1, una acumulación de residuos básicos en la mitad N-terminal de la molécula, y una preponderancia de residuos ácidos e hidrofóbicos en la porción C-terminal. La fracción F1 presenta, sin embargo, una "polaridad" de signo opuesto. Aunque su estructura primaria no se ha elucidado aún, si se conoce la composición de aminoácidos de los péptidos procedentes de tres diferentes regiones de la cadena polipeptídica (Bustin y col., 1969), lo que ha permitido determinar que la mitad amino-terminal de la histona F1, aunque ligeramente básica, no presenta una preponderancia de lisina y arginina, por lo que no está tan cargada como la porción N-terminal de otras histonas. La fracción F1 se diferencia de las demás en que la acumulación de aminoácidos básicos se da en la mitad C-terminal de la molécula, donde mas del 40% de los residuos son lisina. Esta porción de la molécula también contiene la gran mayoría de los residuos de prolina, mientras que la región central es rica en aminoácidos hidrofóbicos y presenta una ausencia total de prolina.

Se puede, por tanto, concluir que las moléculas de histonas presentan dos regiones bien definidas en la cadena polipeptídica. Una, rica en residuos básicos y en residuos desestabilizadores de  $\alpha$ -hélice, que es probablemente el lugar de unión al DNA. La segunda región presenta una composición semejante a la de las proteínas globulares y contiene la mayoría de los residuos con al-

ta posibilidad de formación de estructura secundaria; es el lugar donde se producen las interacciones proteína-proteína.

#### 1.4.3. ESTUDIOS FISICOS DE LA CONFORMACION DE HISTONAS

Las cuestiones que se plantean a la vista de la anterior discusión giran alrededor de los siguientes puntos:

- . Posibilidad de que las histonas adopten una conformación helicoidal. Factores que afectan su contenido en  $\alpha$ -hélice en disolución.
- . Localización de las estructuras secundarias dentro de la molécula de histona. Posibilidad de que estas estructuras se den en las regiones específicas de la cadena polipeptídica que sugieren las secuencias de aminoácidos.
- . Determinación de las zonas de la molécula donde se producen las interacciones histona-histona. Posibilidad de su identidad con las regiones que presentan estructuras secundarias ordenadas.

Los estudios físicos de las conformaciones de histonas contribuyen a aclarar estos problemas.

##### 1.4.3.1. Estudios de histonas en estado sólido

Los primeros estudios físicos de las conformaciones de histonas se llevaron a cabo sobre la totalidad del material extraído, no sobre las fracciones aisladas (Bradbury y col., 1962; Elliott y col., 1962; Zubay y Doty, 1959). Los espectros infrarrojos (IR) de películas sólidas formadas a partir de disoluciones acuosas mostraron la presencia de dos bandas de amida que se atri-

buyeron en un principio a la conformación de  $\alpha$ -hélice. Posteriormente se comprobó que la conformación  $\beta$  extendida absorbe también cerca de estas frecuencias, por lo que no es posible asignar estos picos a la forma  $\alpha$ -hélice de un modo inequívoco. La velocidad de deuteración de películas de histona expuestas a  $D_2O$  se ha estudiado siguiendo los cambios de intensidad sufridos por las bandas de amida en el espectro IR, lo que mostró que una fracción de los hidrógenos lábiles amídicos se intercambian muy lentamente (Bradbury y col., 1962). La sugerencia de que el componente de intercambio lento pudiera deberse a protones del grupo guanidinio de la cadena lateral de la arginina (Wishnia y Saunders, 1962), se desechó tras comprobar que una banda resultante de las vibraciones del grupo guanidinio deuterado aparecía totalmente en cuestión de segundos, demostrando que los hidrógenos lábiles de este grupo intercambian rápidamente (Bradbury y col., 1967 b). Es posible concluir, por tanto que los hidrógenos que intercambian lentamente proceden de los grupos amídicos, y que este hecho puede explicarse con la intervención de estos grupos en conformaciones secundarias de la histona. Los espectros IR de películas formadas a partir de disoluciones acuosas de histonas recientemente preparadas, no mostraron ninguna banda de absorción característica de estructura  $\beta$  de lo que se dedujo que la película de histona total contiene una mezcla de  $\alpha$ -hélice y cadena estadística. Estudios de dispersión rotatoria óptica (Elliott y col., 1962) de películas semejantes también detectaron la presencia de un componente de  $\alpha$ -hélice, cuya participación aumentaba en las películas formadas a partir de disoluciones de histona en dicloroetanol, disolvente que favorece la formación de hélice.

Aunque no se ha encontrado conformación  $\beta$  extendida en muestras de histona recientemente preparadas, sí ha aparecido esta estructura, en proporción variable, en muestras liofilizadas y en material envejecido (Bradbury y col., 1965). La presencia de esta conformación, en estas condiciones, ha sido atribuida a una

parcial desnaturalización de las muestras de histonas.

Zubay y Wilkins (1962) llevaron a cabo estudios de difracción de rayos X de películas de histonas, detectando unos anillos difusos de difracción que atribuyeron a la presencia de un componente de  $\alpha$ -hélice. En algunas imágenes, la aparición de una reflexión adicional se interpretó como compatible con la presencia de estructura  $\beta$  producida por efectos de desnaturalización. Los resultados obtenidos por estudios de rayos X están en completo acuerdo con los deducidos de espectroscopía infrarroja, demostrando que las películas de histona recientemente preparada contienen una mezcla de conformaciones en  $\alpha$ -hélice y cadena estadística, y que las muestras desnaturalizadas contienen estructura  $\beta$

#### 1.4.3.2 Estudios de espectroscopía óptica

La medida de la actividad óptica de proteínas en disolución ofrece una considerable información acerca de su estructura. La gran asimetría de la molécula proteica es responsable de la gran respuesta que se obtiene con la aplicación de las técnicas de dispersión rotatoria óptica (ORD) y dicroísmo circular (CD). Aun--que todos los aminoácidos excepto glicocola contienen al menos un átomo de carbono asimétrico, la mayoría de ellos producen sólo pequeñas bandas de ORD y CD (Toniolo, 1970); es la conformación de la proteína, la asimétrica y periódica distribución de las unida--des peptídicas en el espacio, la que da origen a los espectros característicos de ORD y CD.

Estas técnicas no son capaces de proporcionar una exacta determinación estructural, posible por otro lado con el método de difracción de rayos X, ni una detallada descripción de determinados entornos, como suministra la resonancia magnética nu---clear, pero presentan sin embargo la ventaja de su capacidad para una aproximación rápida de las conformaciones presentes en disoluciones diluídas de proteínas. Su alta sensibilidad permite que

sean usadas para el estudio de reacciones que implican cambios en la actividad óptica, como desnaturalizaciones y transiciones hélice-cadena.

Los primeros estudios de histona total en disolución mediante dispersión rotatoria óptica (ORD), demostraron que, en agua y en urea 8M, la proteína se encuentra en forma de cadena estadística mientras que en dicloroetanol, disolvente que favorece la conformación en hélice, la histona adopta una estructura parcialmente helicoidal (Elliott y col., 1962). Se han efectuado estudios semejantes con las cinco fracciones de histonas aisladas, disueltas en diferentes medios (Bradbury y col., 1965, 1967 a; Jirgensons y Hnilica, 1965). El contenido en hélice crece con el pH y con la fuerza iónica de la disolución, en todas las fracciones de histonas excepto la F1, donde el efecto es mucho menos notable. Este hecho está directamente relacionado con los resultados obtenidos en los estudios de disoluciones y películas de esta histona mediante espectroscopía infrarroja, que mostraron la presencia de estructura  $\beta$ -extendida. No está determinado si esta estructura  $\beta$  es intra o intercatenaria, pero su presencia en un gran número de preparaciones de F1, llevó a sugerir que esta conformación puede ser el resultado de una marcada tendencia que esta fracción presenta a formar estructura de cadena extendida, y que, en la nucleohistona nativa, puede existir en esta forma (Bradbury y col., 1967 a).

Jirgensons y Hnilica (1965) estudiaron la conformación de las fracciones de histonas en disoluciones acuosas y salinas, y observaron la repercusión que tiene el cambio de la sal sobre el contenido en estructura ordenada de la proteína. La variación del catión de la sal utilizada en la disolución, no conduce a grandes diferencias en su capacidad para provocar la ordenación de la histona. Sin embargo, el cambio de anión presenta un efecto mucho mas marcado, siendo el anión fosfato el mas eficiente en la

inducción del aumento en el contenido helicoidal.

La aplicación de la técnica de dicroísmo circular, mas moderna, al estudio de la conformación de histonas ha conducido a resultados muy semejantes, que indican que la estructura que adoptan en solución depende en gran manera del disolvente. Los medios que contienen urea o presentan bajo pH o fuerza iónica favorecen la conformación de cadena estadística, mientras que la elevación del pH o de la concentración salina provoca un aumento en el contenido en estructuras ordenadas.

Fasman y col., (1970) han estudiado la conformación de la fracción muy rica en lisina F1, concluyendo que, en disolución acuosa, adopta una estructura de cadena estadística. Estos mismos autores sometieron a esta histona a roturas con N-bromo--succinimida, obteniendo dos grandes fragmentos peptídicos cuyos espectros de CD reflejaban una tendencia mucho mayor a formar estructuras organizadas por parte de la mitad N-terminal, como cabría deducir de la mayor concentración de residuos de lisina en la región C-terminal (Fasman y col., 1971). También con la técnica de CD se han estudiado las interacciones histonas-DNA en los complejos formados a partir de DNA y fracción F1 intacta y entre DNA y cada uno de los dos fragmentos de la histona (Fasman y col. 1971). Asimismo, se ha investigado la influencia que la fosforilación o la maleilación de esta proteína tiene en su unión al DNA (Adler y col., 1972; Burnotte y col., 1973).

Estudios similares se han llevado a cabo sobre la histona F2A1 en disolución y formando complejo con el DNA (Wagner, 1970; Shih y Fasman, 1971; Li y col., 1971). Los resultados han permitido concluir una dependencia de la conformación de esta fracción con la fuerza iónica de la disolución, mientras que su estructura en el complejo, depende de su unión al DNA, mas que de la fuerza iónica (Shih y Fasman, 1971). Li y col., (1972)

Wickett y col., (1972) y Smerdon e Isenberg (1973, 1974) han estudiado mediante CD y anisotropía de fluorescencia, los cambios conformacionales inducidos por la adición de sales a las soluciones acuosas de histona F2A1, y han detectado la existencia de dos tipos de transiciones; una, rápida, que ha sido atribuida a la formación de  $\alpha$ -hélice y otra, mas lenta, relacionada con la formación de estructura  $\beta$ , aunque se admite la posibilidad de que se den otros cambios en las estructuras secundaria y terciaria. La constante de velocidad para el cambio lento es del orden de minutos u horas, dependiendo de las concentraciones de sal y de histona, y del tipo de anión presente. La dependencia del proceso rápido con la concentración de F2A1 sería también compatible con un fenómeno de dimerización (Li y col., 1972).

La aplicación de las técnicas de CD y anisotropía de fluorescencia al estudio de la estructura de la histona F2B en disolución, en función del pH y la fuerza iónica (D'Anna e Isenberg 1972), no ha permitido detectar ningún cambio conformacional semejante a la transición lenta observada en el caso de la fracción F2A1. El aumento de la concentración salina en la disolución, provoca una elevación en el contenido helicoidal de la estructura de la histona, siendo el anión fosfato 40 veces mas eficaz que el cloruro, como inductor de este cambio conformacional. Adler y col., (1974) han estudiado también la interacción entre el DNA y la histona en complejos formados con la proteína íntegra y con los fragmentos peptídicos resultantes de la rotura de la fracción F2B con bromuro de cianógeno. Como era de esperar ambos péptidos provocan distintos efectos sobre el CD del DNA en el complejo.

D'Anna e Isenberg (1974 a,c) han investigado los cambios conformacionales sufridos por las histonas F2A2 y F3 en disolución, en función de la concentración de fosfato añadido, mediante las técnicas de CD, anisotropía de fluorescencia y dispersión de luz. Esto les ha permitido comparar los comportamientos que siguen las fracciones F2A1, F2B, F2A2 y F3 en disolución al variar

la fuerza iónica de la misma. Estos autores concluyen que las cuatro histonas sufren un cambio conformacional rápido, inducido por la adición de sal, siendo la conformación de F2A2 y F3 mucho mas sensible a variaciones de la concentración salina que las otras dos fracciones. Este cambio rápido, se ajusta a un simple modelo de dos estados, en el caso de F2A1, F2B y F3, pero no en el de F2A2, donde parece ser mas complejo. Es curioso que, tras sufrir este cambio conformacional, las cuatro histonas presentan un contenido en  $\alpha$ -hélice muy semejante, lo que ha llevado a sugerir a estos mismos autores la posibilidad de que esta similitud en la estructura secundaria de las diferentes fracciones de origen a interacciones histona-histona, bien dimerización (Li y col., 1972; Smerdon e Isenberg, 1974) o bien formación de complejos cruzados (D'Anna e Isenberg, 1973, 1974 b,d). Además de este cambio rápido, las fracciones F2A1 y F3 muestran una transición lenta, donde se produce una agregación de la proteína. Este proceso mas lento, es sensible a la temperatura y a la concentración de histona; una vez transcurrido, se detecta la presencia de estructura  $\beta$  en la molécula. A las concentraciones de proteína utilizadas, estos autores no detectan tal cambio en las otras dos histonas.

#### 1.4.3.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), una técnica potencialmente capaz de dar información acerca del entorno químico que rodea a determinados aminoácidos dentro de una cadena polipeptídica, también se ha aplicado al estudio de la conformación de histonas. Las mejoras en la resolución de los espectrofotómetros de NMR y los rápidos avances en el trabajo de secuencia de histonas, han hecho posible localizar, parcialmente, las regiones de estas proteínas que sufren transiciones estructurales en respuesta a cambios producidos en la atmósfera que les rodea. Como se conoce a partir de los trabajos de secuencia, las distintas regiones de la molécula de cada histona tienen unas características químicas totalmente diferentes, lo que hace razonable su-



poner que las propiedades físicas de estas zonas, y quizá su participación en la función biológica, serán muy diferentes. Esto hace de las histonas sujetos dignos de estudio por NMR, ya que la distribución asimétrica de los distintos tipos de aminoácidos dentro de la cadena polipeptídica, permite seguir de cerca el comportamiento de las distintas regiones de la proteína, observando los picos de resonancia producidos por las cadenas laterales de las diferentes clases de aminoácidos.

Las investigaciones de Boublik y col., (1970 a,b) sobre las fracciones F1, F2B y F2A1 de histonas demostraron que los picos de resonancia derivados, principalmente, de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos resultaban ensanchados, y su intensidad relativa reducida, cuando las proteínas se encontraban en disolventes que favorecían la formación de estructuras ordenadas. Los cambios espectrales observados indican restricciones en la libertad de movimientos de los grupos implicados, lo que revela que esos aminoácidos están localizados en regiones de la histona que sufren transiciones estructurales a formas ordenadas. Por el contrario, los picos de resonancia que proceden de grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos básicos, resultan relativamente inafectados por las transiciones inducidas por el disolvente. Estas observaciones están de acuerdo con las conocidas tendencias que los diferentes aminoácidos presentan a estabilizar estructuras ordenadas ( $\alpha$ -hélice). Los espectros de NMR, junto con las conocidas distribuciones de los aminoácidos en las histonas, indican que las porciones central y C-terminal de las proteínas, ricas en aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, son las que participan en la formación de estructuras ordenadas, mientras que las regiones ricas en aminoácidos básicos, predominantemente las áreas N-terminales, tienden a permanecer en conformaciones desordenadas. Existe sin embargo, alguna ambigüedad respecto a la naturaleza de las estructuras ordenadas encontradas, en las que, probablemente contribuyen, en distinto grado, tanto la  $\alpha$ -hélice como las estructuras  $\beta$  intra- e intermoleculares.

La interpretación de los datos de NMR que supone cam  
bios estructurales en la región C-terminal para explicar la pérdi  
da en intensidad de resonancia de aminoácidos hidrofóbicos, es la  
 mas probable. Sin embargo, puede verse en la Tabla III que, aun--  
 que realmente existe una distribución no uniforme de los distin--  
 tos aminoácidos en la molécula de cada histona, también es cierto  
 que se da suficiente solapamiento como para no poder excluir la  
 posibilidad de formación de alguna estructura secundaria en las  
 zonas muy básicas. Para eliminar esta ambigüedad, la histona F2B  
 se sometió a rotura con bromuro de cianógeno por los residuos de  
 metionina en posiciones 59 y 62, separándose los péptidos N- y  
 C-terminales resultantes. Los estudios detallados de NMR y CD (di  
croísmo circular) de ambos fragmentos (Bradbury y col., 1971) con  
firmaron las conclusiones iniciales, e incluso las ampliaron, al  
 tratar de localizar, dentro de cada péptido, las regiones capaces  
 de formar estructuras ordenadas. Se estimó que la región N-termi--  
 nal y una menor secuencia en la porción C-terminal de la F2B in--  
 tacta, regiones que contienen una alta proporción de residuos de  
 lisina, no participan en la formación de estructura helicoidal ba  
jo ninguna de las condiciones probadas, pero pueden ser lugares  
 de unión al DNA. La zona central de la molécula muestra una mayor  
 tendencia a adoptar formas ordenadas y está probablemente implica  
da en interacciones proteína-proteína (Bradbury y Rattle, 1972).  
 Estudios de las capacidades que ambas mitades de la histona F2B  
 tienen para unirse al DNA y estabilizarlo contra la desnaturaliza  
ción térmica (Li y Bonner, 1971) llevan a conclusiones semejantes.  
 Parece, por lo tanto, que ambos extremos de esta fracción tienen  
 sitios de unión al DNA; el N-terminal, con su gran zona básica  
 puede estabilizarle en mayor grado que el C-terminal, menor y me--  
 nos básico.

La distribución de aminoácidos en la histona F1 es  
 similar a la encontrada en la F2B. Estudios de NMR indican que  
 los residuos en posiciones 50 a 106 tienden a formar estructuras  
 ordenadas al aumentar la fuerza iónica, mientras que el resto de

la molécula permanece como cadena estadística. Por otro lado, los espectros IR y de ORD muestran que bajo estas condiciones, la fracción F1 tiende a formar estructura  $\beta$ -extendida (Bradbury y col., 1967 a). Se ha conseguido efectuar un alineamiento antiparalelo de los residuos 50 a 106, que permite emparejamientos que favorecen las interacciones iónicas e hidrofóbicas entre cadenas laterales, para muchos de los aminoácidos (Bradbury y Rattle, 1972). Parece, pues, probable que la estructura  $\beta$  intermolecular sea el modo primario de asociación de la histona F1.

Los espectros de NMR de la histona F2A1 revelan que únicamente la región N-terminal, en una secuencia de longitud comprendida entre un medio y un tercio de la molécula, permanece móvil en medios moderadamente iónicos (Boublik y col., 1970 a; Bradbury y Rattle, 1972). Así parece probable que la conocida tendencia de la F2A1 a formar asociaciones intermoleculares (Diggle y Peacocke, 1971) está basada en interacciones a través de la mitad C-terminal de la molécula. Tales interacciones pueden ser importantes en la unión de la histona F2A1 al DNA, ya que parece existir un efecto cooperativo en la asociación de esta proteína al DNA (Barclay y Eason, 1972). En un reciente estudio, Pekary y col. (1973) analizaron cuidadosamente los efectos de la concentración de proteína, fuerza iónica y pH sobre los espectros de NMR de la histona F2A1, llegando a las siguientes conclusiones: Los 20 residuos del extremo C-terminal de la proteína, una región hidrofóbica, tienen una estructura secundaria relativamente rígida que les hace "invisibles" en espectros de NMR. En D<sub>2</sub>O, la pérdida de picos de resonancia con concentraciones crecientes de histona es debida a asociaciones intermoleculares que llevan a la formación de dímeros. Los cambios en intensidad espectral observados cuando la concentración de NaCl se hace superior a 0.01M se deben, principalmente, a la formación de agregados de orden superior. Si estos hechos observados en la fracción F2A1 pudieran extrapolarse a otras histonas, ciertas conclusiones previas relacionadas con cambios conformacionales podrían necesitar modificaciones que inclu-

yeran los efectos de agregación y precipitación.

También se ha examinado por espectroscopía de NMR la conformación de la histona F2C (Bradbury y col., 1972). Puesto que por el momento no se conoce su secuencia de aminoácidos completa, no es posible identificar las regiones responsables de interacciones proteína-proteína. Investigaciones preliminares indican que la porción N-terminal de esta histona, menos básica que el segmento C-terminal, se encuentra implicada en interacciones muy específicas que conducen a la formación de estructuras ordenadas.

Por otra parte, no se han publicado estudios de NMR de las fracciones F2A2 y F3. Basándose en la distribución de aminoácidos que presentan estas proteínas (Tabla III), podría predecirse que las características de estructura secundaria de la histona F2A2 pudieran ser semejantes a las de las fracciones F1 y F2B, con extremos capaces de unirse al DNA, y con una región central implicada en interacciones proteína-proteína. La histona F3 parece ser mas comparable a la otra histona rica en arginina, F2A1 en la que sólo el extremo N-terminal tiene una abundancia de lisina y arginina para favorecer la unión al DNA.

La posibilidad de que los segmentos de histonas que se asocian al DNA formen estructuras ordenadas cuando están en contacto con él, no puede ser eliminada basándose en los estudios de histonas en disolución. Es bastante posible que cuando las cargas positivas de las cadenas laterales de lisina y arginina de estas regiones resulten neutralizadas por asociación con los fosfatos del DNA, sea energéticamente favorable la formación de estructuras ordenadas. Por otro lado, la posición espacial de las cadenas laterales de los aminoácidos durante la interacción con la doble hélice del DNA, puede dar lugar a la formación de regiones de  $\alpha$ -hélice en la proteína. Experimentos con modelos muestran que la ordenación en  $\alpha$ -hélice de la región N-terminal de la histona F2A1 produ

ciría una distribución espacial muy favorable para las interacciones entre aminoácidos básicos y fosfatos del DNA (Shih y Bonner, 1970). Sin embargo, no es fácil obtener evidencia experimental directa de un modelo como el descrito. Los estudios de la conformación de las histonas por CD y ORD en la cromatina son difíciles de interpretar a causa del solapamiento de las contribuciones procedentes del DNA, así como por el hecho de que tanto la conformación del DNA como la de las proteínas constituyentes, pueden cambiar cuando se forma el complejo.

#### 1.5. DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA

=====

Se han aislado y caracterizado las histonas de una gran variedad de organismos, desde unicelulares a mamíferos, incluyendo invertebrados y plantas (ver apartado 1.1.4.). Asimismo se ha estudiado el grado de heterogeneidad y especificidad, que manifiestan, predominantemente algunas fracciones de histonas, a lo largo de la evolución. No obstante, el conocimiento de las histonas de insectos es, hoy día, muy incompleto, siendo un organismo de gran interés para estos estudios dada su situación intermedia en la escala evolutiva así como los cambios muy definidos en su desarrollo durante la metamorfosis y diferenciación.

Han sido muy pocos los trabajos publicados sobre histonas de insectos y la mayoría carecen de un análisis detallado de sus fracciones. Esta falta de interés, quizá hay que achacarla a las dificultades que encierran el aislamiento y la caracterización de histonas de estos organismos, como puede observarse en los primeros trabajos publicados (Lindh y Brantmark, 1965; Dick y Johns, 1969 a).

Lindh y Brantmark (1965) aislaron las proteínas básicas nucleares de la mosca Calliphora erythrocephala en el estadio de adulto farato. Estas proteínas, muy complejas electroforéticamente, no fueron identificadas ni analizadas, lo que parece demostrar la poca eficacia del método. Dick y Johns (1969) obtuvieron histonas totales de adulto de Drosophila melanogaster, utilizando NaCl 2M y partiendo de grandes cantidades de insecto, dada la poca proporción de DNA presente (Hastings y Kirby, 1966). Tanto la composición de aminoácidos como la imagen electroforética de estas histonas diferían bastante de las de timo de ternera; su identificación y caracterización no se llevaron a cabo, pues resultaron infructuosos todos los intentos realizados para su fraccionamiento. Este trabajo puso claramente de manifiesto la existencia de histonas en insectos pero no llegó a revelar el número exacto de fracciones ni sus propiedades.

Investigaciones posteriores (Pallotta y Berlowitz, 1970; Harris y Forrest, 1970) indicaron que las histonas de insectos están constituidas por cinco o seis fracciones al menos; pero para asegurar esto era necesario acometer el fraccionamiento y caracterización de estas fracciones.

Los trabajos mas recientes, en los que ya se profundiza mas en estos estudios se han realizado en el díptero Drosophila melanogaster. Cohen y Gotchel (1971) estudiaron las histonas de este insecto, en cuya imagen electroforética detectaron cinco bandas principales y otras de menor movilidad. Estas histonas se sometieron a proceso de fraccionamiento, pero el aislamiento y caracterización de fracciones, a excepción de la de menor movilidad, fue muy incompleto. Posteriormente, Oliver y Chalkley (1972) realizaron un estudio mas profundo de las histonas de adulto de Drosophila melanogaster, llevando a cabo el fraccionamiento y la caracterización de las mismas. Sus resultados mostraron que cuatro de las cinco fracciones principales son muy semejantes a timo de

ternera, mientras que la restante -F1- presenta notables diferencias.

Conclusión de todo lo expuesto es que las investigaciones en el campo de histonas de insectos están aún en sus comienzos, y que se requiere la realización de trabajos más profundos para el conocimiento de estas proteínas en esta clase de organismos. Todos estos motivos han sido la causa de que la investigación que se recoge en la presente Memoria se centrara sobre el estudio de las histonas de insectos.

Como material biológico se ha elegido el díptero Ceratitis capitata, cuyo ciclo vital está bien definido (Hinton, 1968), al mismo tiempo que se conoce con bastante precisión la bioquímica de su desarrollo (Fernández Sousa y col., 1971a, 1971 b; Municio y col., 1971, 1972 a, 1972 b; Castillón y col., 1973). El estudio de las histonas de este insecto en las distintas etapas de su diferenciación es la base de una línea de investigación que se desarrolla en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Complutense. El trabajo descrito en esta Memoria, realizado en este Centro, forma parte de esa línea de investigación y se ha enfocado sobre el estadio de adulto farato, nunca empleado hasta la fecha para la obtención de histonas de ningún insecto.

El primer objetivo del trabajo planteado es, pues, el aislamiento y caracterización de las histonas totales de dicho material biológico, utilizando para ello, con las oportunas variantes, los diversos métodos descritos para tal fin. El fraccionamiento de dichas histonas constituye un segundo paso en la investigación presente. Esta etapa es evidentemente necesaria para una correcta asignación de las distintas fracciones obtenidas, pero al mismo tiempo, este fraccionamiento es imprescindible a la

hora de pretender el aislamiento de fracciones puras, proceso que constituye la tercera fase en este trabajo.

En efecto, un conocimiento profundo de las histonas de un organismo requiere el estudio detallado de cada una de sus fracciones aisladas. Así, el fraccionamiento de las histonas totales de Ceratitidis, servirá de base para el aislamiento, en estado puro, de sus fracciones. En este momento, la investigación habrá de dirigirse hacia alguna histona en especial, y la elección recaerá sobre la fracción F2A1. Esta histona es quizá la mejor conocida en un mayor número de organismos; su estudio comparado ha permitido establecer puntos acerca de su comportamiento evolutivo. La caracterización física y química de la fracción F2A1 de Ceratitidis permitirá la inclusión de las histonas de insectos en este estudio comparado. Con este fin, la tercera fase de esta investigación se dirigirá al aislamiento y la purificación de esta histona, para, en una cuarta etapa, proceder a su estudio estructural.

Esta etapa abarcará la caracterización física y química de la proteína, así como un conjunto de estudios físicos y conformacionales de la misma. El interés de la determinación de la estructura primaria de esta histona queda muy disminuido, dada la constancia evolutiva que presenta, en favor del que tiene su estudio conformacional. La investigación de la estructura secundaria de histonas sólo se ha iniciado recientemente, cuando se ha podido disponer de fracciones aisladas puras. En particular, la conformación de la histona F2A1 de timo de ternera se ha estudiado en disoluciones en diferentes condiciones, por medio de la aplicación de distintas técnicas, entre las que el dicróismo circular y la resonancia magnética nuclear son las que mejores resultados aportan. La segunda sin embargo requiere el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína para la interpretación de datos. El dicróismo circular, por otra parte, es quizá la mejor,



entre las técnicas hoy disponibles, para la detección de cambios en la conformación global de la proteína, por lo que su uso es fundamental para un estudio semicuantitativo. Esto justifica la dirección seguida en la última etapa de esta investigación, consistente en el estudio de la estabilidad y comportamiento conformacionales de la fracción F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Este estudio estructural permitirá efectuar comparaciones con histonas homólogas.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

=====

El díptero Ceratitis capitata se cultivó en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas según el procedimiento descrito por Municio y col. (1970).

Los insectos, recogidos en el estadio de adulto farato, se conservaron a 0°C hasta su utilización. En la mayoría de los experimentos se usaron lotes de 500 a 1.000 g.

### 2.2. PREPARACION DE CROMATINA CRUDA

=====

El aislamiento de histonas totales o de fracciones de histonas se llevó a cabo, en cualquier caso, a partir de cromatina cruda, por lo que la preparación de este material es paso previo a cualquier otro.

Los insectos, en el estadio de adulto farato, se ho

homogeneizaron en 10 volúmenes (p/v) de NaCl 0.075M-EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 0.025M, pH 8.0, (Bonner y col., 1968), por agitación con bolas de porcelana durante dos horas. El homogeneizado se filtró a través de varias (de cuatro a seis) capas de gasa y se centrifugó a 1.500 g durante 15 minutos en el rotor angular GSA de la centrífuga Sorvall RC-2B. Los sedimentos se lavaron tres veces con el medio de homogeneización y otras tres con tampón Tris (Tris (hidroximetil) aminometano) 0.05M-HCl, pH 8.0. El sedimento final, denominado cromatina cruda, se utilizó directamente para el aislamiento de histonas totales o fracciones de histonas.

En algunos experimentos se usó NaCl 0.14M-citrato trisódico 0.01M (Dick y Johns, 1969 a) como medio de homogeneización. En ocasiones la homogeneización del material biológico se realizó en un Omni-Mixer Sorvall.

## 2.3. AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES

=====

Las histonas totales se obtuvieron a partir de la cromatina cruda siguiendo dos procedimientos diferentes:

- Disociación salina de la cromatina cruda.
- Extracción de la cromatina con ácido diluido.

### 2.3.1. DISOCIACION SALINA

El aislamiento de histonas totales por disociación salina de la nucleohistona se efectuó según el método de Dick y Johns (1969 a), con ligeras modificaciones.

La cromatina cruda se resuspendió en NaCl 0.14M y se centrifugó a 1.500 g 15 minutos. Este proceso de lavado se repitió

dos veces mas. En ocasiones los sedimentos se lavaron también con NaCl 0.25M que elimina mucha proteína extracromosomal (Johns y Forrester, 1969).

El sedimento final se resuspendió en la menor cantidad posible de NaCl 20% con ayuda de un homogeneizador de aspas Omni-Mixer Sorvall a 220 voltios durante 1 minuto. Posteriormente la suspensión se mantuvo con agitación, en frío, durante 18 horas. En estas condiciones las histonas y el DNA se disocian y solubilizan. El material insoluble se separó por centrifugación a 30.000 g durante 80 minutos. El sobrenadante se clarificó por filtración a través de placa filtrante de poro nº 4 para eliminar cualquier partícula en suspensión. A continuación se añadió HCl 1N en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 0.25N; en este medio ácido, los ácidos nucleicos y proteínas de carácter ácido precipitan y pueden separarse por centrifugación. El cloruro sódico se eliminó del sobrenadante por diálisis frente a agua destilada durante 18 h, con cuatro o cinco cambios de agua. Las histonas se precipitaron del sobrenadante por adición de ocho volúmenes de acetona y se recogieron por centrifugación; se lavaron tres veces con acetona y se secaron a vacío.

En algunos casos las histonas se precipitaron por adición de TCA (ácido tricloroacético) 100% (p/v) hasta una concentración final del 18%. En este caso la diálisis frente a agua destilada para eliminar el NaCl se puede omitir, ya que la sal es soluble en TCA 18% y se elimina en el sobrenadante; sin embargo hay que tener la precaución de lavar el precipitado una o dos veces con TCA 18% con el fin de eliminar la sal que pueda estar presente en el líquido que impregna el sedimento. Seguidamente, las histonas se lavaron con acetona-HCl (2ml de HCl concentrado por 100 ml de acetona); la presencia de HCl tiene por objeto transformar los tricloroacetatos de histonas, bastante solubles en acetona, en hidrocloruros (Johns y Butler, 1962). Finalmente, el sedimento se lavó dos veces con acetona y se seco a vacío.

### 2.3.2. EXTRACCION ACIDA

Las histonas totales se aislaron por extracción ácida de la cromatina cruda con HCl 0.25N siguiendo el método de Johns (1967 a).

La cromatina cruda se lavó tres veces con NaCl 0.14M y, en ocasiones, dos veces mas con NaCl 0.25M. El sedimento final se resuspendió en Tris 0.01M, pH8, y se le adicionó un volumen igual de HCl 0.5N. La suspensión se agitó durante tres horas a 4°C y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se guardó y el sedimento se suspendió de nuevo en HCl 0.25N y se mantuvo en agitación durante una hora. El extracto ácido se separó del material insoluble por centrifugación, como anteriormente. Los sobrenadantes de la primera y segunda extracción se reunieron y clarificaron por filtración en placa filtrante del nº 4. Las histonas se precipitaron del sobrenadante clarificado, con ocho volúmenes de acetona; en ocasiones se añadieron unas gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado para favorecer la precipitación, ya que los sulfatos de histona son mas insolubles que los hidroccloruros. Las histonas se sedimentaron por centrifugación y se lavaron y secaron como se ha descrito anteriormente.

### 2.4. EXTRACCION SELECTIVA

=====

Con el fin de conseguir mezclas mas sencillas de histonas, a partir de las cuales poder iniciar el aislamiento de la fracción F2A1, se siguieron dos métodos de extracción selectiva a partir de la cromatina cruda:

- Disociación selectiva con sales.
- Extracción selectiva con disolventes orgánicos.

#### 2.4.1. DISOCIACION SELECTIVA CON SALES

El material biológico se homogeneizó con cinco volúmenes de NaCl 0.14M-citrato trisódico 0.01M, en un Omni-Mixer Sorvall a 220 voltios durante cinco minutos. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 1.100 g durante 30 minutos. El sedimento se lavó siete veces con NaCl 0.14M, centrifugándose a 1.100 g 15 minutos. El precipitado final se resuspendió en un volumen de NaCl 0.25M-Tris 4mM, pH 7.5, y la suspensión se agitó en frío durante dos horas y media. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos. El sedimento se lavó con NaCl 0.14M y posteriormente se trató con NaCl 0.5M-Tris 5mM, pH 7.5, de la misma manera. Las sucesivas extracciones se realizaron con disoluciones de NaCl 0.75M, NaCl 1.0M y, por último NaCl 2.0M, todas ellas en tampón Tris-HCl 5mM, pH 7.5.

Los extractos salinos se acidificaron con HCl 1N hasta una concentración final de HCl 0.25N, y el precipitado formado se separó por centrifugación a 30.000 g durante 20 minutos. En los sobrenadantes se precipitaron las proteínas extraídas añadiendo suavemente TCA 100% hasta una concentración final del 18%. Los precipitados se recogieron por centrifugación y a los sobrenadantes se les añadió nuevamente TCA 100% hasta una concentración final del 30%. Las proteínas precipitadas con TCA 18% y con TCA 30% se lavaron una vez con acetona-HCl, tres veces con acetona y se secaron a vacío.

## 2.4.2. EXTRACCION SELECTIVA CON DISOLVENTES ORGANICOS

### 2.4.2.1. Extracción con etanol-HCl

La cromatina cruda se preparó por el método descrito anteriormente. A continuación se lavó dos veces con etanol 90%, tras lo cual se sometió a extracción con etanol-HCl. Para ello, una cantidad de cromatina cruda equivalente a 20 mg de DNA, procedente de 100 g de material biológico inicial, se suspendió en 100 ml de etanol 80%-HCl 0.25N, y se mantuvo en agitación durante 18 horas. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos; el sobrenadante se conservó y el se dimento se sometió a una segunda extracción con la mitad de volu men de etanol-HCl durante tres horas. Tras una centrifugación se mejante se obtuvo un segundo sobrenadante que se unió al proce dente de la primera extracción, y a ambos extractos se añadieron cinco volúmenes de acetona. Las proteínas precipitadas se lava ron dos veces con acetona y se seca ron a vacío.

La extracción con etanol-HCl se efectuó también directamente sobre el homogeneizado de insecto. En estos experimen tos el material biológico se homogeneizó en cinco volúmenes (p/v) de etanol 95% mediante un Omni-Mixer Sorvall. A continuación se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos y el sedimento se lavó una vez con etanol 95%. Sobre el material resultante se llevaron a cabo dos extracciones sucesivas con etanol 80%-HCl 0.25N, si guiendo la misma metodología que se ha detallado anteriormente. La unión de ambos extractos se clarificó por placa filtrante nº 4, y las proteínas presentes se precipitaron por adición de cinco volúmenes de acetona.

El precipitado obtenido se sometió posteriormente a un proceso de purificación basado en sucesivas disoluciones y re precipitaciones. En primer lugar, se disolvió en una pequeña can

tividad de agua, y a la solución se añadió TCA 100% (p/v) hasta al canzar una concentración de 1N. Así precipitó un sedimento pegajoso sobre el que se añadió etanol 95%; la disolución no fue total, y el material insoluble se separó por centrifugación. Las histonas se precipitaron del sobrenadante por adición de tres vo lúmenes de acetona y unas gotas de HCl, se lavaron tres veces con acetona y se secaron a vacío.

#### 2.4.2.2. Extracción con etanol-cloruro de guanidinio

La extracción directa de la cromatina cruda con etanol-GuCl (cloruro de guanidinio) se efectuó siguiendo el método de Johns (1967 b) con algunas modificaciones.

La cromatina cruda, obtenida como se ha descrito an teriormente, se lavó dos veces con NaCl 0.25M. A continuación, se sometió a otros dos lavados con etanol 80% con el fin de asegurar que el disolvente etanol-GuCl utilizado para la extracción no se diluya con el agua presente en el residuo húmedo.

El sedimento final se sometió a extracción con etanol 75%-GuCl 10% (p/v), pH 7.0, suspendiendo una cantidad de cro matina cruda equivalente a 20 mg de DNA en 100 ml de medio de ex tracción. La suspensión se mantuvo en agitación durante 18 horas a 4°C. A continuación se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se conservó y el sedimento se sometió a una nueva extracción con 50 ml de etanol-GuCl por 20 mg de DNA, con agitación durante tres horas. Tras una centrifugación semejante se separó el sobrenadante y el sedimento se extrajo por tercera vez con etanol-GuCl, 25 ml por 20 mg de DNA. Mediante una nueva centrifugación se consiguió el tercer sobrenadante que se unió a los dos anteriores. El extracto se clarificó por filtración a través de placa filtrante del nº 4. Las histonas se precipitaron por adición de cuatro volúmenes de acetona y se secaron a vacío.



## 2.5. FRACCIONAMIENTO DE HISTONAS F2A.

=====

Como se verá posteriormente, en Resultados y Discu  
sión las proteínas mayoritarias en el extracto de etanol-GuCl  
son las histonas F2A1 y F2A2.

La separación de ambas fracciones se llevó a cabo  
por precipitación fraccionada:

- a partir del extracto de etanol-GuCl.
- a partir de solución de ambas histonas en ácido  
diluído.

### 2.5.1. PRECIPITACION FRACCIONADA DEL EXTRACTO ETANOL-GuCl

Con el fin de separar las fracciones de histonas  
presentes en el extracto de etanol-GuCl se efectuó una precipita  
ción fraccionada con acetona sobre dicho extracto.

La mezcla de sobrenadantes procedentes de las tres  
extracciones de cromatina cruda con etanol-GuCl, se purificó por  
filtración a través de placa filtrante nº 4, como ya se ha des--  
crito. Sobre el filtrado se añadió un volumen de acetona y se de  
jó en reposo, en frío, durante la noche. El precipitado se reco  
gió por centrifugación, y al sobrenadante se le añadieron otros  
tres volúmenes de acetona. Tras un nuevo reposo en frío se obtu  
vo, por centrifugación, un segundo precipitado. Ambos sedimentos,  
obtenidos por precipitación con uno y tres volúmenes de acetona  
del extracto de etanol-GuCl, se lavaron una vez con una disolu--  
ción idéntica en composición al medio de donde se precipitaron,  
dos veces con acetona y se secaron a vacío.

En ocasiones, el primer precipitado, obtenido tras  
adición de un volumen de acetona, se separó por filtración a  
través de placa filtrante del nº 4. El filtrado se sometió a la

segunda precipitación con otros tres volúmenes de acetona y el primer precipitado se recuperó dejando pasar lentamente a través de la placa filtrante HCl 0.01N, que redisolvió la proteína retenida. La histona redisuelta se precipitó por adición de seis volúmenes de acetona, se lavó con acetona y se seco a vacío.

#### 2.5.2. PRECIPITACION FRACCIONADA DE LA DISOLUCION ACIDA DE F2A

Las histonas extraídas de la cromatina cruda con etanol-GuCl, se trataron de fraccionar por redisolución en ácido diluido y precipitación fraccionada con acetona.

Para este fraccionamiento se utilizaron:

- ácido sulfúrico 0.1N.
- ácido clorhídrico 0.01N.

##### 2.5.2.1. Precipitación fraccionada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Las fracciones de histonas presentes en los extractos de etanol-GuCl se precipitaron, en conjunto, por adición de cuatro volúmenes de acetona, como ya se ha descrito. Las proteínas, una vez lavadas y secas, se redisolvieron en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N a una concentración de 1 mg/ml. La disolución no fue total, y el material insoluble se separó por centrifugación. Sobre el sobrenadante se efectuó una precipitación fraccionada por adición sucesiva de acetona, hasta completar uno, dos, tres, cuatro y ocho volúmenes. Los diferentes precipitados se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con un medio igual a aquél de donde fueron precipitadas, dos veces con acetona y se secaron a vacío.

### 2.5.2.2. Precipitación fraccionada de HCl

Las fracciones de histonas extraídas de la cromatina por etanol-GuCl se aislaron como ha sido descrito en el apartado 2.4.2.2. Su separación se llevó a cabo por el siguiente procedimiento (Hoare, 1971).

La mezcla de proteínas se disolvió a temperatura ambiente en HCl 0.01N, a una concentración de 16.6 mg/ml. A la disolución se le añadieron 2 ml de HCl concentrado por gramo de histona, y, posteriormente, 2.75 volúmenes (170 ml/gramo de proteína) de acetona, con agitación rápida. El precipitado se separó por centrifugación y se lavó una vez con el medio acetona-HCl de precipitación (100 ml/g de histona), dos veces con acetona y se secó a vacío.

El sobrenadante de esta primera precipitación se mezcló con el primer lavado y sobre la mezcla se añadió acetona, 0.9 volúmenes del volumen total. El precipitado resultante se recogió por centrifugación, se lavó con un disolvente igual al medio de precipitación, dos veces más con acetona, y se seco a vacío.

### 2.6. PURIFICACION DE HISTONA F2A1

=====

Las imágenes electroforéticas de las preparaciones de histona F2A1 revelan la presencia de un material de movilidad prácticamente nula que impurifica dichos preparados. El hecho de que este material no penetre casi apenas nada en el gel de poliacrilamida al 20% usado en la electroforesis indica un gran tamaño molecular, y los métodos utilizados para la purificación de la histona F2A1 se basan en esta propiedad.

Se han seguido dos procedimientos para esta purificación:

- Electroforesis preparativa.
- Cromatografía en gel.

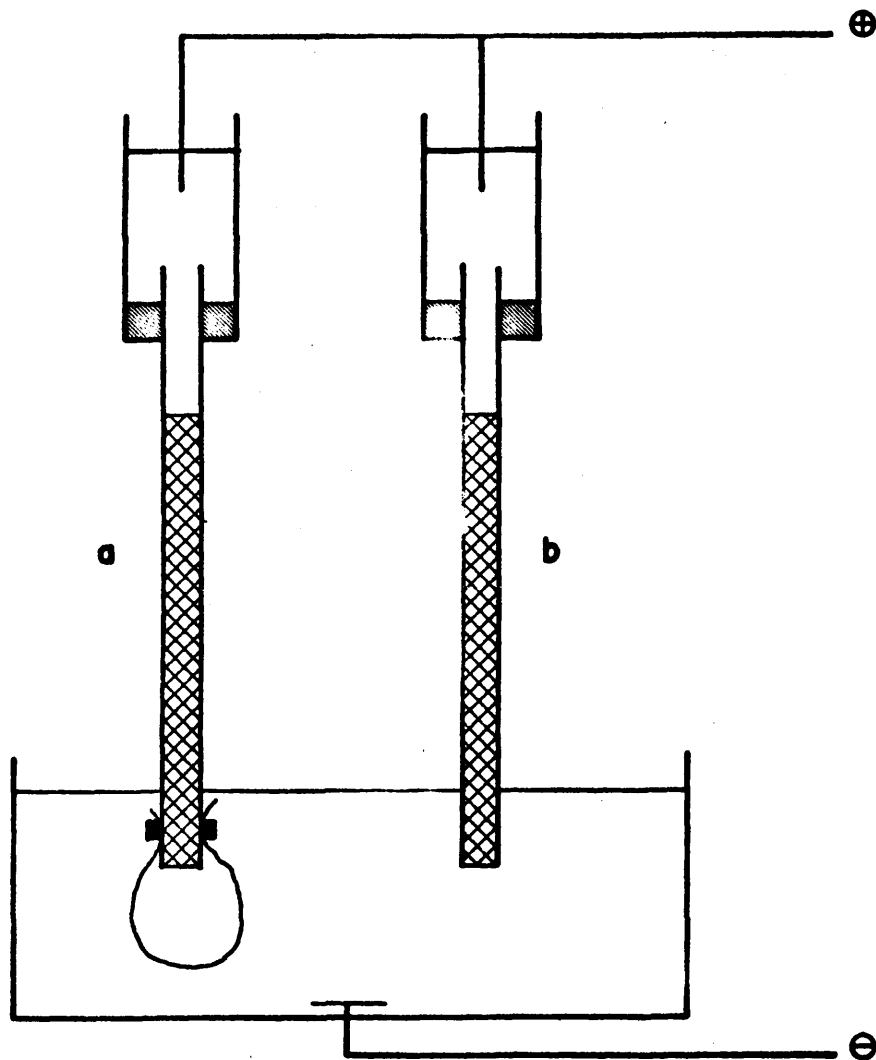
#### 2.6.1. PURIFICACION DE HISTONA F2A1 POR ELECTROFORESIS PREPARATIVA

Se montaron dos geles de poliacrilamida al 20% iguales a los usados para electroforesis analítica como muestra la Figura 2.

Los extremos superiores de ambos geles se pusieron en contacto, independientemente, con el ánodo de una fuente de tensión a través de unas cubetas conteniendo una solución de ácido acético 0.01N. Los extremos inferiores se introdujeron en una cubeta común que contenía el mismo acético 0.01N y a la que se conectó el cátodo. El extremo inferior de uno de los geles, gel a, se tapó mediante una bolsa de diálisis, de forma que el material proteínico que abandonase el gel quedase retenido en su interior.

En el gel a se aplicaron 12 mg de preparación impura de F2A1 disueltos en acético 0.01N. En el segundo gel, gel b, se aplicaron 50  $\mu$ l de disolución del mismo material en urea 8M-acético 0.01N a una concentración de 1mg/ml, disolvente y concentración usados en la aplicación de muestras en electroforesis analítica. Este gel b se utilizó como testigo.

La electroforesis se llevó a cabo aplicando una diferencia de potencial de 175 voltios entre ambos polos. A las 24 horas de desarrollo, se retiró el gel testigo b, se tiñó con Negro Amido y se destiñó siguiendo el mismo procedimiento que en la electroforesis analítica, que se describe posteriormente. Al mismo tiempo se retiró la bolsa de diálisis del gel a, y el líquido contenido se liofilizó. Se colocó una nueva bolsa y se continuó el de



**Figura 2. Montaje de geles de poliacrilamida, utilizado para la purificación de la fracción 1 de Ceratitis capitata.**

sarrollo de la electroforesis durante otras 12 horas, transcurridas las cuales se recogió la nueva solución interna de la que se recuperó el material proteico por liofilización.

Tras las 36 horas de electroforesis del gel a se tomó la solución de ácido acético inmediatamente superior al gel, que presentaba un material fibroso en suspensión, y se liofilizó. La parte superior del gel donde se esperaba encontrar el material de alto peso molecular, se separó, se troceó en fragmentos de 1 mm<sup>3</sup>, aproximadamente, y se extrajo con ácido acético 0.01N a 37°C durante 40 horas. Los fragmentos de gel se separaron por centrifugación y el sobrenadante se liofilizó. El resto del gel a se tiñó y destiñó como se describe en el apartado de electroforesis analítica.

#### 2.6.2. PURIFICACION DE HISTONA F2A1 POR CROMATOGRAFIA EN GEL

La purificación de F2A1 por cromatografía en gel, se llevó a cabo sobre lotes de 100 mg de la fracción cruda, aislada como se ha descrito en el apartado 2.5.2.2. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se disolvieron 100 mg de proteína en 4 ml de ácido acético 0.01N. El material insoluble se eliminó por centrifugación, y el sobrenadante se aplicó a una columna de Sephadex G-100 (1.6 x 100 cm). La elución se efectuó a un flujo de 30 ml/h, con ácido acético 0.01N que contenía Hibitane (Clorhexidina, ICI) 0.002% como agente micostático. Se recogieron fracciones de 3.6 ml, en las que se valoró el material proteico midiendo la absorbancia a 230 y 268 nm en un espectrofotómetro Beckman DB-G. Las fracciones correspondientes a un mismo pico se reunieron y liofilizaron.

## 2.7. METODOS ANALITICOS

=====

### 2.7.1. VALORACION DE DNA

La valoración del DNA se realizó por espectrofotometría a 260 nm del DNA hidrolizado, y por colorimetría valorando la desoxirribosa con el reactivo de difenilamina (Dische, 1930). En el primer caso es imprescindible eliminar previamente el RNA presente en la muestra. Para ello, la disolución problema se sometió a la marcha de Hill y col. (1971) con modificaciones que se describen a continuación.

A una alícuota de muestra se añadió TCA 100% hasta alcanzar una concentración del 20% con el fin de precipitar ácidos nucleicos y proteínas. El sedimento se lavó dos veces con dos volúmenes de TCA 5% para eliminar nucleótidos presentes, y una vez mas con dos volúmenes de etanol-éter (3:1 v/v). El residuo se hidrolizó con dos volúmenes de KOH 0.3N a 37°C durante 18 horas. Transcurrido el tiempo de hidrólisis se enfrió rápidamente y se añadieron 0.9ml de PCA (ácido perclórico) 1.35N frío, con el fin de precipitar el material no hidrolizado.

El precipitado se lavó con PCA 0.25N para eliminar los restos de RNA hidrolizado. El residuo lavado, que contiene el DNA, se hidrolizó con dos volúmenes de PCA 0.15N, a 90°C durante 20 minutos, se enfrió y se añadió 1 ml de PCA 1.35N. El hidrolizado se recuperó en el sobrenadante y el residuo se lavó con PCA 0.25N cuyo sobrenadante se reunió con el anterior para la valoración del DNA. El DNA hidrolizado, libre de RNA, pudo ya valorarse por absorción a 260 nm. El coeficiente de extinción es  $E_{1\text{cm}}^{260} = 0.224$  para una disolución de 0.001% (Webb y Levy, 1958).

La valoración colorimétrica del DNA por el método de la difenilamina puede realizarse en presencia de RNA, ya que la sustancia que detecta el reactivo es la desoxirribosa, siempre que no se encuentren presentes sustancias que interfieran con la reacción (Burton, 1956). El método utilizado (Dische, 1930) fue el siguiente:

A un volumen de disolución problema no inferior a 1 ml se añadieron dos volúmenes de reactivo de difenilamina (1 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético y 2.75 ml de  $H_2SO_4$  concentrado), y se calentó a  $100^{\circ}C$  durante 10 minutos. Se enfrió y se midió la absorbancia a 595 nm frente a un blanco en el que la solución problema se sustituyó por agua destilada. Este método detecta cantidades de DNA comprendidas entre 50 y 500 g/ml. La curva patrón puede construirse con DNA estándar (50-500 g/ml) o con desoxirribosa (20-100 g/ml); en este último caso, la cantidad de DNA se calculó multiplicando el valor de desoxirribosa obtenido por el factor de corrección 2.5. Cuando se utilizó DNA estándar la solución patrón se sometió a los mismos tratamientos que la solución problema.

## 2.7.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

### 2.7.2.1. Electroforesis sencilla

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó según el método de Johns (1967 a), excepto el teñido y des~~teñido~~ de los geles que se realizó según la modificación desc~~ri~~ta posteriormente por el mismo autor (Dick y Johns, 1969 b).

#### Polimerización

Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 13.5 cm de longitud y 0.8 cm de diámetro interno. En ocasiones se



utilizaron tubos de 11.9 cm de largo y 0.6 cm de diámetro interno. Para facilitar la separación del gel una vez desarrollada la electroforesis, los tubos de vidrio se siliconaron antes de efectuar la polimerización; para ello, los tubos se trataron con una disolución de diclorodimetilsilano al 0.5% en benceno.

La mezcla de polimerización se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 40 g de acrilamida y 0.6 g de bisacrilamida en 150 ml de agua destilada. La disolución se filtró a través de papel Whatman nº 1 y al filtrado se añadieron 0.25 ml de TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamina). La mezcla se ajustó a pH 3.0 con ácido acético glacial y a continuación se desgasificó a vacío para eliminar el aire que podría formar burbujas dentro del gel. Por último, se añadieron 0.3 g de persulfato amónico, previamente disuelto en agua para no agitar la mezcla de polimerización, y se ajustó el volumen a 200 ml con agua destilada.

Manteniendo los tubos en posición vertical y tapados por su extremo inferior, se llenaron con la mezcla de polimerización hasta una distancia de 2.5 cm de su extremo superior. Las burbujas que puedan quedar dentro de la disolución, en la parte inferior o adosadas al vidrio, se eliminaron presionando el tapón de goma de la parte inferior. Para evitar que la superficie superior del gel quedara cóncava, se añadió lentamente sobre cada tubo una capa de agua con la ayuda de una aguja hipodérmica, evitando que se removiera la superficie, de forma que la interfase entre la capa de agua destilada y la mezcla de polimerización fuera plana. Seguidamente se dejaron en reposo durante cinco o seis horas, hasta que la polimerización se completó; transcurrido este tiempo se retiró el agua de la superficie del gel y se substituyó por ácido acético 0.01N.

### Pre-electroforesis

Con el fin de eliminar los iones necesarios para la polimerización, TEMED  $^{2+}$  y  $S_2O_8^{2-}$ , que perjudican la separación de bandas y su reproducibilidad, los geles se sometieron a pre-electroforesis.

Los tubos se colocaron en la cubeta de electroforesis y sus compartimentos se llenaron con ácido acético 0.01N. A continuación se conectó a la fuente de tensión con el polo negativo abajo y se estableció un potencial de 125 voltios durante tres horas. Al cabo de este tiempo se renovó el ácido acético de las cubetas y se hizo pasar la corriente otras tres horas. La operación se repitió manteniendo el mismo voltaje durante seis horas más. Los geles así equilibrados pueden utilizarse seguidamente para el desarrollo electroforético, o guardarse, en posición vertical, recubiertos de acético 0.01N hasta su utilización.

### Desarrollo de la electroforesis

Las muestras de histonas se disolvieron a una concentración de 0.2-1.0 mg/ml, según la complejidad de la muestra, en urea 8M-acético 0.01N.

Los tubos previamente equilibrados se colocaron en la cubeta de electroforesis llena de ácido acético 0.01N. La disolución de las muestras se depositó suavemente con ayuda de una microjeringa conectada en su extremo a un capilar de polietileno, sobre la superficie del gel, evitando su difusión en el líquido circundante. Seguidamente se conectó a la fuente de tensión -el polo negativo con la parte inferior- y se aplicó una corriente de 175 voltios durante seis horas.

Transcurrido este tiempo los geles se recuperaron fracturando el tubo de vidrio.

### Revelado

Los geles se introdujeron durante 12 horas al menos, en una disolución de Negro de Alizarina R al 0.5% (p/v) en etanol 30% (v/v). En ocasiones, se tiñeron con Negro Amido 0.5% (p/v) en ácido acético 1M.

El desteñido de los geles teñidos con Negro de Alizarina se realizó introduciéndolos en etanol al 40% y calentando en baño de agua a 55°C. La disolución de desteñido se renueva hasta el transparentado total. El desteñido de los geles teñidos con Negro Amido se realizó por electroforesis en sentido transversal.

### Densitometrado

En las ocasiones en las que se requirió una determinación cuantitativa de la distribución de proteína en las bandas electroforéticas, los geles se densitometraron en un microdensitómetro Canalco, modelo G, equipado con un computador para el registro automático de las áreas.

#### 2.7.2.2. Electroforesis doble

Para realizar comparaciones inequívocas de las movilidades de dos muestras, se sometieron a electroforesis simultánea sobre el mismo gel, mediante el procedimiento descrito por Johns (1969).

Los geles, una vez equilibrados, se dispusieron en la cubeta llena de ácido acético 0.01N y se elevaron ligeramente por encima del nivel del líquido. La superficie del gel se secó cuidadosamente usando papel absorbente.

Las muestras a comparar se disolvieron en el disolvente de muestra -0.5-2.0 mg/ml dependiendo de la complejidad

esperada- y se aplicaron en zonas opuestas de un disco de papel de filtro -Whatman nº 1 de 7 mm de diámetro-, evitando la difusión y el contacto entre ambas mediante una línea de silicona -diclorodimetilsilano al 0.5% en benceno- aplicada previamente a lo largo del diámetro del disco de papel usando un capilar fino.

El disco de papel, conteniendo las muestras, se colocó seguidamente sobre la superficie seca del gel y se cubrió inmediatamente con 1 ml de disolvente de muestra. A continuación se añadió rápidamente el disolvente de desarrollo hasta el lleno completo del tubo. El tubo se introdujo en la cubeta a su posición original y la electroforesis, el teñido y el desteñido se llevaron a cabo como se ha descrito para la electroforesis sencilla.

### 2.7.3. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

El peso molecular de la histona F2A1 se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecilsulfato sódico), según la técnica de Panyim y Chalkley (1971).

Los geles a pH 7.6 se prepararon mezclados 7.5 ml de solución A -acrilamida 60%, N,N'-metilen-bisacrilamida 0.4% en agua-, 10.8 g de urea, 15 mg de SDS, 50  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) y 1.25 ml de tampón fosfato 1.0M, pH 7.6. La disolución resultante se ajustó a pH 7.6 con HCl 1N, se añadió agua destilada hasta 30 ml y, finalmente, 6 mg de persulfato amónico. La disolución de acrilamida polimeriza en 30 minutos y se dejó una hora más.

Las muestras se disolvieron en tampón fosfato 0.01M, pH 7.6, SDS 0.05%, conectado el polo positivo en la parte inferior, durante seis horas a 80 voltios.

Una vez finalizado el desarrollo electroforético los geles se recuperaron por fractura del tubo, y se tiñeron con una disolución de Negro Amido 0.1% y ácido acético 20% durante cinco horas como mínimo. El destañido se realizó sometiendo los geles a electroforesis en sentido transversal. Los geles fueron densitometrados como se ha descrito anteriormente.

#### Cálculo de pesos moleculares

A las muestras problema se les añadió, antes de ser aplicadas, histona total de timo de ternera como patrón, ya que dadas las pequeñas variaciones en movilidad que ocurren entre distintos geles, se debe construir una curva patrón para cada gel.

En la electroforesis en SDS la histona total de timo de ternera se resuelve en cuatro bandas que corresponden, de mayor a menor movilidad, a las fracciones F<sub>2</sub>A<sub>1</sub> (Pm 11.000), F<sub>2</sub>A<sub>2</sub> (Pm 12.500), F<sub>2</sub>B + F<sub>3</sub> (Pm 14.000) y F<sub>1</sub> (Pm 21.000).

La curva patrón se construye representando gráficamente las movilidades relativas de cada fracción en función del logaritmo de su peso molecular.

$$Mr = \frac{\text{Distancia origen gel a fracción X}}{\text{Distancia origen gel a F}_{2A_1} \text{ de timo}}$$

#### 2.7.4. ANALISIS DE AMINOACIDOS

Las proteínas se hidrolizaron con HCl azeótropo -de 0.5 a 1 ml por mg de proteína- a 110°C, en tubos Pyrex cerrados a vacío. Generalmente se efectuaron hidrólisis de la misma muestra a diferentes tiempos, con el fin de poder extrapolar los resultados a tiempo cero -para los valores de Ser, Thr y Tyr- y corregir los datos de aquellos residuos de aminoácidos que forman enlaces peptídicos mas resistentes a la hidrólisis -Val, Ile-.

Finalizado el tiempo de incubación, los tubos se abrieron y los hidrolizados se llevaron a sequedad a vacío sobre NaOH.

Los análisis de aminoácidos se realizaron en un analizador automático Durrum modelo D-500, provisto de un computador PDP-8M que automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado. El tiempo de análisis fue de 100 minutos. La muestra se aplicó disuelta en tampón citrato, pH 2.20, y el proceso de elución se efectuó con disoluciones tampón de citrato sódico a pH 3.25, 4.25 y 7.09. Para regenerar la columna de resina después de cada análisis se utilizó una disolución de NaOH 0.3N que contiene 0.25 de EDTA por litro.

#### 2.7.5. DETERMINACION DEL RESIDUO N-TERMINAL

La identificación del residuo de aminoácido N-terminal se realizó utilizando el método del cloruro de dansilo (Gray, 1972; Pérez-Aranda, 1975).

Para ello se tomaron de 0.2 a 1 nmol de proteína disueltos en unos 100  $\mu$ l de agua en un tubo Durham, y se llevaron a sequedad. A continuación se añadieron 10  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M, se centrifugó y se evaporó el disolvente.

El reactivo se preparó mezclando volúmenes iguales de Cl-DNS (cloruro de dansilo) en acetona -2.5 mg/ml- y agua. 10  $\mu$ l de la mezcla se añadieron sobre la proteína, el tubo se cubrió con papel parafinado y se mantuvo a 45°C durante 30 minutos. El color amarillo de la solución debe desaparecer tras la incubación.

Seguidamente, la solución se llevó a sequedad sobre NaOH y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se adicionaron 20  $\mu$ l de HCl 6N. El tubo se cerró a vacío y se mantuvo de 10 a 14 horas a 105°C. Transcurrido

este tiempo se abrió el tubo y su contenido se secó perfectamente bajo vacío. El residuo se disolvió en 5  $\mu$ l de etanol 95% (v/v).

La separación de los dansilderivados se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina utilizando placas de poliamida (Chen Chin Trading Co., Ltd., Taipei, Taiwan). En una de las caras se aplicó la muestra problema; en la otra, el problema mas una solución de dansilaminoácidos patrones en una concentración de 0.1 mg/ml de cada uno de ellos.

La cromatografía se desarrolló, en primer lugar, con ácido fórmico al 1.5% en agua. La placa se secó perfectamente y se corrió, en dirección perpendicular, en tolueno-ácido acético glacial (10:1, v/v). Una vez seca la placa, los dansilderivados se localizaron por iluminación con luz ultravioleta. Todos los dansilaminoácidos se resuelven con estos dos sistemas, excepto los pares DNS-Glu/DNS-Asp y DNS-Thr/DNS-Ser. Para resolver estos últimos, la placa se desarrolla según la segunda dimensión en una mezcla de acetato de etilo-metanol-ácido acético (20:1:1, v/v/v).

## 2.8. OBTENCION DE DATOS CONFORMACIONALES

=====

El estudio conformacional de la histona F2A1 se desarrolló a partir de los datos obtenidos por dicroísmo circular (CD) de sus disoluciones acuosas. La determinación de la concentración de proteína en disolución, paso previo a cada experimento, se efectuó por métodos espectrofotométricos.

### 2.8.1. DISOLUCIONES DE PROTEINA

Se prepararon disoluciones de F2A1 en agua, a concen

traciones, aproximadas, que variaron entre 0.05 y 0.20 mg/ml, según los casos. Las disoluciones se conservaron a 4°C hasta su uso.

La concentración de proteína se determinó a partir de su absorbancia a 210 nm, utilizando el valor  $E_{1\text{ cm}}^{0.1\%} = 20.5 \pm 0.14$  dl/cm.g (Tombs y col., 1959). Los espectros de absorción ultravioleta se obtuvieron en un espectrofotómetro Cary 14, modelo CM-50, barriendo desde 300 hasta 200 nm. Se usaron células de 1 cm y 2mm de paso óptico.

### 2.8.2. VARIACION DE LA FUERZA IONICA

La disolución acuosa de F2A1 se hizo 0.01M en Tris, por adición de la cantidad adecuada de Tris 0.5M, pH 7.8.

Las concentraciones deseadas de NaCl se obtuvieron añadiendo, progresivamente, volúmenes precisos de disoluciones salinas, previamente preparadas a las concentraciones mas convenientes -0.4M, 2M y 4M- y conservadas a 4°C hasta su utilización.

Todas las adiciones a la disolución de histona, se efectuaron con agitación constante, e inmediatamente antes de medir el espectro de CD de la solución resultante.

### 2.8.3. VARIACION DEL PH

En los experimentos destinados a investigar la conformación de la histona en función del pH, la disolución acuosa de F2A1 se hizo 6M en cloruro de guanidinio (Gu-Cl), con el fin de eliminar cualquier posible agregación existente. A continuación, la solución se dializó frente a HCl 0.01N, y la concentración de F2A1 se determinó espectrofotométricamente como se ha descrito an-



teriormente. El pH de la disolución se ajustó a 2.0 por adición de HCl 1.0N y glicocola 0.2M, y se fue elevando progresivamente añadiendo NaOH concentrada. Las adiciones se efectuaron con agitación constante, e inmediatamente antes de la obtención de los espectros de CD.

#### 2.8.4. ESPECTROS DE CD

Los espectros de CD de las distintas disoluciones de la histona F2A1 se registraron a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ , en un espectropolarímetro Cary 61.

El espectro barrió desde 260 nm hasta 210 nm, a una velocidad de barrido de 10 nm/min. La línea base se ajustó para el disolvente utilizado -Tris 0.01M, pH 7.8- aunque, en algunos casos particulares, se hicieron las correcciones de datos necesarios por referencia al espectro del disolvente. La anchura de rendija se programó para una resolución del orden de 1 nm, constante a lo largo de las longitudes de onda barridas. Se utilizaron células de 1 y 4 cm de paso óptico, y los datos se obtuvieron en términos de elipticidad.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES

=====

La primera etapa del presente trabajo, la preparación de histonas totales, se abordó inicialmente utilizando el método descrito para adulto de Drosophila melanogaster (Dick y Johns, 1969 a), dada su similitud con Ceratitis capitata. Posteriormente se aplicó el procedimiento de extracción ácida de la cromatina cruda (Johns, 1967 a), y se compararon los resultados obtenidos, que se detallan a continuación.

##### 3.1.1. DISOCIACION SALINA

La cromatina cruda de adulto farato de Ceratitis capitata se preparó según el método descrito en el apartado 2.2. Las histonas totales se aislaron por disociación salina de la cromatina cruda siguiendo el procedimiento de Dick y Johns, (1969 a) con ligeras modificaciones, tal como se describe en la sección 2.3.1. Las proteínas así extraídas se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida según el método de Johns (1967 a), detallado en el apartado 2.7.2.

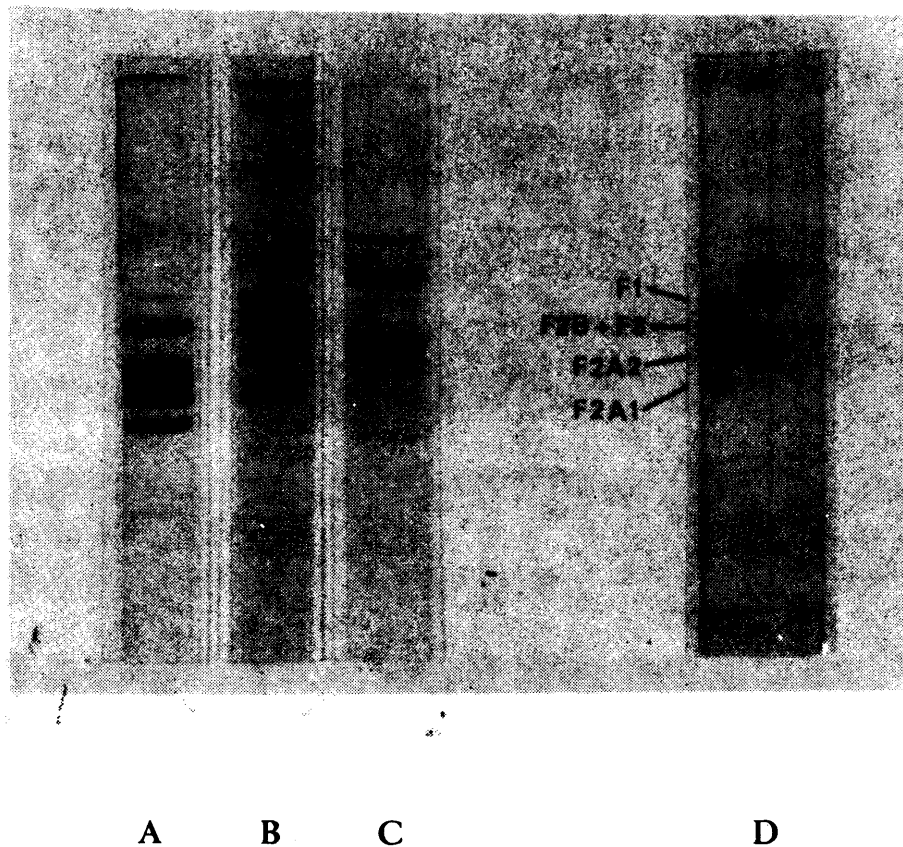
En la Figura 3 se muestran las imágenes electroforéticas de las histonas totales de adulto farato extraídas con NaCl 20% (B) y de las histonas totales de timo de ternera (A) que se utilizan como patrón de comparación.

Utilizando la técnica de electroforesis doble (Johns, 1969 a) que elimina todas las variables que puedan restar valor a una comparación entre geles distintos (Fig. 3 D) se observa claramente la presencia de dos bandas de gran intensidad, ambas de menor movilidad que las fracciones de timo de ternera, y la ausencia de una banda de movilidad comparable a la fracción F2A1 de timo. Este hecho resulta extraño a primera vista, ya que esta fracción es la más constante a lo largo de la evolución y no es de esperar su ausencia en histonas de insectos. Puede, sin embargo, encontrarse una posible causa a esta falta en el hecho de que esta fracción es una de las que mas tarde se disocia de la cromatina a concentraciones salinas altas (Wilhelm y Champagne, 1969), así como en la tendencia que esta histona presenta a la agregación (Diggle y Peacocke, 1971). Así pues, es posible que aún estando presente en la cromatina y debido a las particulares características del método de obtención, no se haya extraído o se haya eliminado, agregada, durante la centrifugación.

Otra característica de esta preparación, que queda patente en su imagen electroforética (Fig. 3), es la ausencia de contaminación por parte de proteína no-histona, que se pondría de manifiesto por la presencia de bandas de baja movilidad. Solamente se aprecia una banda débil próxima a la superficie del gel, que ha sido identificada (Rojo, 1975) como un agregado de la fracción F1.

Utilizando este método que conduce a preparaciones poco contaminadas con proteínas no-histona, se comete el error de un desigual aislamiento de fracciones. Este hecho también se observa en las imágenes electroforéticas de las histonas de Drosophila, publicadas por Dick y Johns (1969 a).

El análisis de aminoácidos de la preparación de histona total obtenida por disociación salina se efectuó según el método descrito en el apartado 2.7.4. El resultado se recoge en la Ta-



**Figura 3.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de timo de ternera. (B) Histonas totales de adulto farato de Ceratitidis capitata, extraídas por disociación salina de la cromatina cruda, con NaCl 20%. (C) Id., precipitadas con TCA 18%. (D) Electroforesis doble de histonas totales de timo de ternera (izquierda) e histonas totales de adulto farato de Ceratitidis capitata, extraídas por disociación salina de cromatina cruda, con NaCl 20% (derecha).

En esta y siguientes figuras, la migración es desde arriba (ánodo) hacia abajo.

bla IV, donde se presentan también las composiciones de las histonas totales obtenidas por disociación salina a partir de Drosophila melanogaster (Dick y Johns, 1969 a) y de timo de ternera (Loeb 1968). La comparación de estos resultados, revela la alta proporción, en adulto farato de Ceratitis, de los aminoácidos treonina y arginina, tanto mas sorprendente esta última cuanto que se trata de una preparación carente de una banda posteriormente identificada como correspondiente a una de las fracciones ricas en arginina. Como consecuencia de esta alta proporción, la relación de aminoácidos básicos a ácidos (B/A) se encuentra aumentada y la de lisina a arginina (Lys/Arg) notablemente disminuída. Estas anomalías serán discutidas mas adelante.

Los resultados obtenidos no dependen del método utilizado para la preparación de cromatina cruda, ya que tanto el NaCl-EDTA (Bonner y col., 1968) como el NaCl-citrato (Dick y Johns, 1969 a), usados como medio de homogeneización (ver apartado 2.2.) condujeron a los mismos resultados.

No se puede decir otro tanto en lo que respecta al procedimiento seguido para la precipitación de las histonas totales. En la Figura 3 C se muestra la imagen electroforética de las proteínas precipitadas con TCA al 18%. Se observa la ausencia de una de las bandas intensas de baja movilidad cuando se compara con la imagen procedente de la precipitación con acetona (B). Posteriormente se comenta este extremo.

T A B L A IV

Composición de aminoácidos de histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata obtenidas por disociación sa lina de cromatina cruda, comparada con las de otros organismos preparadas por el mismo método.

Aminoácido	Ceratitis capitata	Drosophila melanogaster (1)	Timo de ternera (2)
Acido aspártico	8.2	8.8	4.9
Treonina	10.9	5.4	5.6
Serina	5.6	7.0	5.1
Acido glutámico	9.0	12.4	8.5
Prolina	5.5	4.7	4.6
Glicocola	7.6	8.5	9.3
Alanina	11.3	11.7	13.1
Cisteína	-	-	-
Valina	6.3	5.2	6.4
Metionina	tr	0.2	tr
Isoleucina	3.0	3.3	4.4
Leucina	3.0	7.7	8.0
Tirosina	0.3	1.2	2.6
Fenilalanina	0.9	2.0	1.9
Histidina	1.0	1.8	1.9
Lisina	16.0	16.2	15.0
Arginina	11.2	5.8	8.8
B/A	1.6	1.1	1.9
Lys/Arg	1.4	2.8	1.7

Los datos se dan en moles de aminoácidos por 100 moles.

(1) Dick y Johns, 1969 a

(2) Loeb, 1968

### 3.1.2. EXTRACCION ACIDA

La cromatina cruda se preparó según el procedimiento descrito (apartado 2.2.) y se sometió a extracción con ácido diluido tal y como se detalla en el apartado 2.3.2. La composición de aminoácidos de las proteínas así extraídas se recoge en la Tabla V, comparados con la composición de histonas totales de Drosophila melanogaster (Oliver y Chalkley, 1972) y timo de ternera (Dick y Johns, 1969 c), obtenidas por el mismo procedimiento.

Los preparados de histona total de Ceratitidis muestran contaminación de proteína no-histona, ya que la relación B/A es inferior a la unidad, pero la proporción de los demás aminoácidos es relativamente semejante a la de histonas de Drosophila.

En la Figura 4 A se muestra la imagen electroforética de la preparación de histonas totales de cromatina cruda de adulto farato de Ceratitidis. Se observa la presencia de seis bandas de coloración intensa, que pueden identificarse provisionalmente como histonas, y varias bandas de movilidad menor que pueden corresponder a proteína no-histona.

Para comprobar la semejanza entre esta preparación y las histonas de timo de ternera se realizó una electroforesis doble de ambas muestras, que aparece en la Figura 4 C. De las seis posibles histonas, sólo las dos de mayor movilidad parecen coincidir con fracciones de timo: F2A1 y F2A2. Otras dos tienen movilidad intermedia pero no son coincidentes con ninguna histona de timo. Las dos restantes presentan menor movilidad que la F1 de ternera.

A la vista de estos resultados, parece que la extracción ácida de cromatina cruda permite la obtención de todas las fracciones de histonas, evitándose la pérdida de la fracción com-

T A B L A V

Composición de aminoácidos de histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata obtenidas por extracción ácida de cromatina cruda, comparadas con las de otros organismos preparadas por el mismo método.

Aminoácido	Ceratitis capitata	Drosophila melanogaster (1)	Timo de ternera (2)
Acido aspártico	11.0	8.2	4.9
Treonina	4.4	6.0	5.3
Serina	3.8	6.4	5.0
Acido glutámico	17.5	11.1	8.4
Prolina	4.2	4.6	4.8
Glicocola	8.1	8.5	8.7
Alanina	9.0	12.0	13.6
Cisteína	tr	-	tr
Valina	6.9	5.5	6.2
Metionina	1.2	0.4	0.9
Isoleucina	5.7	4.3	4.4
Leucina	6.0	7.4	7.7
Tirosina	1.4	1.9	2.3
Fenilalanina	2.7	2.2	1.7
Histidina	1.7	1.8	2.3
Lisina	9.3	12.4	14.9
Arginina	7.1	7.3	8.9
B/A	0.6	1.2	2.0
Lys/Arg	1.3	1.7	1.7

Los datos se dan en moles de aminoácidos por 100 moles.

(1) Oliver y Chalkley, 1972

(2) Dick y Johns, 1969 c

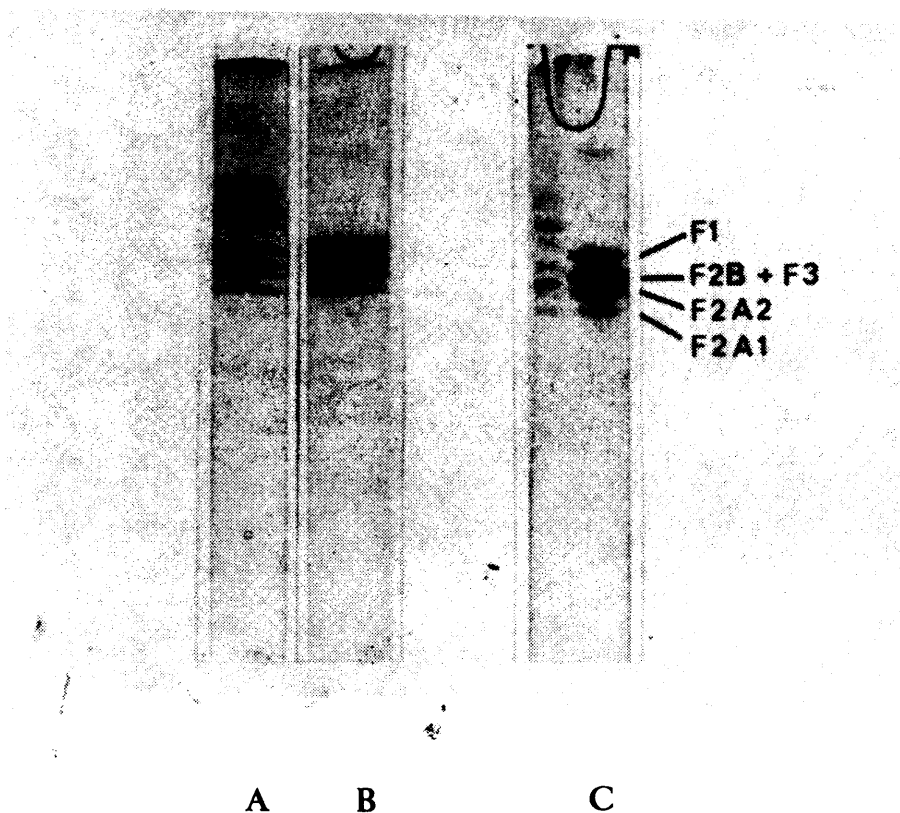


parable en movilidad con la F2A1 de timo de ternera, si bien las preparaciones aparecen excesivamente contaminadas con proteína no-histona.

### 3.1.3. DISCUSION GENERAL DEL AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES

La preparación de histonas totales de un insecto entraña grandes dificultades por la naturaleza de este material biológico. El procedimiento utilizado en primer lugar en la presente investigación para el aislamiento de histonas totales fue el descrito por Dick y Johns (1969 a). Las razones que condujeron a esta elección se basaron fundamentalmente en la similitud entre los dípteros Ceratitis capitata y Drosophila melanogaster y en los motivos que llevaron a los citados autores a la aplicación del método de disociación salina. Por un lado, el aislamiento de histonas requería grandes cantidades de material de partida a causa de la pequeña cantidad de DNA presente en estos organismos (Hastings y Kirby, 1966) y, en segundo lugar, los métodos clásicos de preparación de histonas, válidos para organismos superiores, no resultaron satisfactorios cuando se aplicaron a insectos. Las preparaciones obtenidas conducían a imágenes electroforéticas muy complejas y presentaban gran contaminación por proteína no-histona; sus análisis de aminoácidos daban relaciones B/A muy inferiores a la unidad (Dick y Johns, 1969 a).

El método de disociación salina, por el contrario, conducía a preparaciones mas puras, con una relación B/A igual a 1.12 y con imágenes electroforéticas de cuatro bandas intensas y definidas. Dick y Johns no identificaron estas bandas por lo que no pudieron demostrar la completa eficacia del método ni averiguar sus limitaciones. Lo mas llamativo de sus resultados es la elevada relación Lys/Arg de 2.8 y la casi total ausencia de la banda de movilidad correspondiente a la F2A1 de timo de ternera.



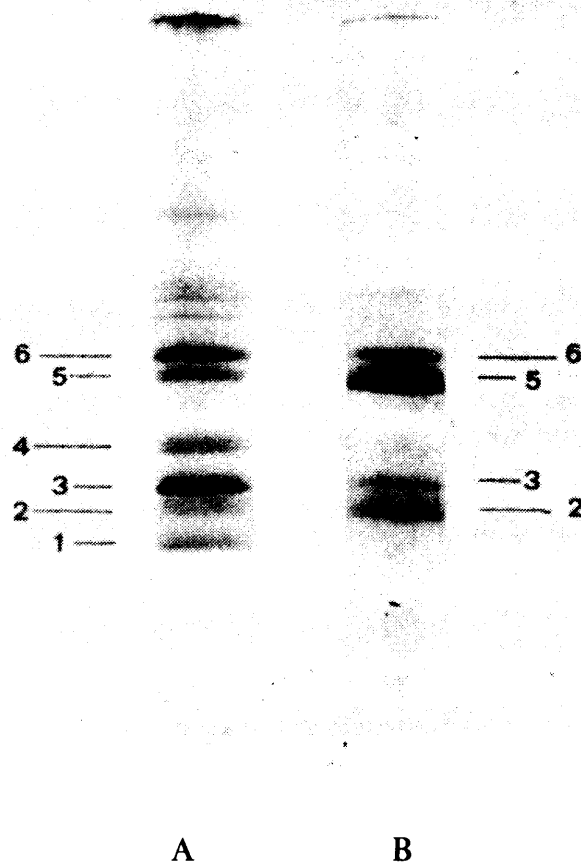
**Figura 4.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata, extraídas con HCl 0.25N, de la cromatina cruda. (B) Histonas totales de timo de ternera. (C) Electroforesis doble de histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata, extraídas de la cromatina cruda con HCl 0.25N (izquierda) e histonas totales de timo de ternera (derecha).

En el adulto varato de Ceratitis capitata, el método conduce a preparaciones con características semejantes a excepción de la relación Lys/Arg, que resulta inferior a lo que cabría esperar.

Parece, pues, evidente, que las condiciones de extracción son responsables de estas anomalías. Sería necesario realizar un estudio profundo del comportamiento de la nucleoproteína frente a distintas concentraciones de NaCl para tratar de encontrar las condiciones que permitan el aislamiento de todas las fracciones cuantitativamente sin solubilizar proteínas extracromosomales. Pero para poder dar una interpretación justa a estos resultados es requisito previo obtener preparaciones que contengan todas las fracciones de manera inequívoca y esto sólo es posible por extracción ácida de la cromatina cruda.

Los resultados obtenidos con este segundo procedimiento confirman lo apuntado por Dick y Johns (1969 a); se obtienen preparaciones bastante contaminadas e imágenes electroforéticas complejas. Sin embargo, en esas bandas se deben encontrar todas las fracciones de histonas presentes en la cromatina del insecto, probablemente entre las seis bandas de mayor movilidad. Este número puede parecer excesivo a simple vista, dado que, en general, esta técnica electroforética resuelve las histonas totales de la mayoría de los organismos en solo cuatro bandas, pero es preferible de momento no destacar posibles fracciones, pues los pocos datos que existen en la bibliografía sobre histonas de insectos de extracción ácida refieren la presencia de cinco o seis bandas en sus imágenes electroforéticas (Pallotta y Berlowitz, 1970; Oliver y Chalkley, 1972).

La confirmación de estos resultados requería el aislamiento de histonas a partir de una preparación mas pura. Trabajos paralelos a los descritos en esta Memoria, llevaron a la par-



**Figura 5.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitidis capitata, extraídas con HCl 0.25N de cromatina parcialmente purificada (Rojo, 1975). (B) Histonas totales de adulto farato de Ceratitidis capitata, extraídas por disociación salina de la cromatina cruda, con NaCl 20%.

Las bandas principales se numeraron según su movilidad.

cial purificación de la cromatina (Rojo, 1975). La extracción ácida de la misma condujo a la obtención de una preparación de histonas totales cuya imagen electroforética se muestra en la Figura 5 A. En ella se aprecia claramente como las seis bandas de las posibles histonas han aumentado notablemente en proporción con respecto a las bandas de menor movilidad, indicativas de la pequeña contaminación que aún se encuentra presente. Esto viene a confirmar la presencia de las fracciones de histona entre estas seis bandas, que se identifican provisionalmente numerándolas de mayor a menor movilidad.

También se muestra (Fig. 5 B) la imagen electroforética de la preparación de histonas totales de adulto farato de Ceratitis, obtenida por disociación salina de la cromatina cruda. La comparación de ambas preparaciones permite correlacionar las histonas de adulto farato obtenidas por ambos métodos. Las histonas totales obtenidas por disociación salina contienen solamente cuatro de las seis posibles histonas, esto es, las fracciones correspondientes a las bandas 2,3,5 y 6.

Esta previa identificación de fracciones nos permite igualmente determinar la ausencia de la banda 5 en los preparados de histona total obtenidos por disociación salina y precipitación con TCA 18% (Fig. 3 C). Esta banda 5 ha sido identificada (Rojo 1975) como una proteína específica del pupario. Es soluble en TCA al 18%, lo que explica su desaparición de los preparados de histonas totales precipitados con este ácido (Fig. 3 C). Por otro lado, esta fracción 5 presenta una gran proporción de los aminoácidos treonina -mas del 30%- y arginina -alrededor del 25%- en su composición, y este hecho es la razón de que las preparaciones de histonas totales que contienen esta fracción, revelen, en su composición, unos valores de estos aminoácidos superiores a los que cabe esperar.

### 3.2. FRACCIONAMIENTO

=====

Los procedimientos de fraccionamiento seguidos en el presente trabajo han sido aplicados con dos fines diferentes. Por un lado se ha tratado de contribuir a la identificación de las fracciones de histonas de adulto farato de Ceratitis capitata. La extracción selectiva de un grupo mas o menos numeroso de fracciones, mediante la aplicación de alguno de los procedimientos descritos, ha sido un criterio de identificación ampliamente utilizado (Johns, 1971). Su aplicación al caso particular de este insecto ha posibilitado la identificación de varias fracciones de histonas.

Pero por otro lado, y fundamentalmente, los métodos de fraccionamiento se han utilizado con fines preparativos. El aislamiento de la fracción F2A1, objeto de estudio, ha requerido la puesta a punto de una serie de procedimientos de extracción selectiva ya descritos para otros organismos, pero que han tenido que ser modificados para su aplicación al caso especial de Ceratitis. El uso de estos métodos de fraccionamiento ha contribuido esencialmente al aislamiento de la histona.

Los distintos métodos de fraccionamiento existentes ya han sido presentados y sus ventajas e inconvenientes analizados, en el apartado 1.2.3. De entre todos ellos sólo algunos se han utilizado en el presente trabajo.

Los extraños resultados obtenidos al aplicar el método de disociación salina al aislamiento de histonas totales (apartado 3.1.1.), sobre todo la ausencia de la banda 1 en las imágenes electroforéticas de estas preparaciones, presentaba el suficiente interés como para intentar llevar a cabo un proceso de disociación selectiva de la cromatina por tratamiento con diferentes concentraciones de NaCl. Además la coincidencia de las movili

dades electroforéticas de la banda 1, ausente en estas preparaciones, y de la F2A1 de timo, podría resultar de la homología de ambas proteínas, tanto más cuanto esta fracción parece ser la más estable a lo largo de la evolución (ver apartado 1.4.2.). Esto añadía interés al proceso de la disociación salina de la cromatina. Con estas miras, la disociación selectiva se aplicó al caso del adulto farato de Ceratitis capitata.

Además de la disociación selectiva con sales, se han utilizado en las presentes investigaciones otra serie de procedimientos de extracción selectiva basados en el uso de disolventes orgánicos. Los problemas planteados por los distintos procedimientos de fraccionamiento completo de las histonas totales, no resultan en absoluto compensados por los rendimientos obtenidos en cada una de las fracciones individuales. Esto obligó a desechar este tipo de métodos a la hora de plantear el aislamiento de una cantidad suficiente de histona F2A1 para proceder, posteriormente, a su purificación y estudio. Con este fin resultan mucho más interesantes las variaciones de extracción selectiva basadas en el uso de disolventes orgánicos (ver apartado 1.2.3.2.), que permiten obtener mezclas de histonas más sencillas, a partir de las cuales pueda llevarse a cabo, en una etapa subsiguiente, el aislamiento definitivo. Así se han utilizado los procedimientos de extracción selectiva con etanol-HCl y etanol-cloruro de guanidinio.

### 3.2.1. DISOCIACION SELECTIVA CON SALES

La cromatina cruda de Ceratitis capitata en el estado de adulto farato se sometió a disociación selectiva con NaCl según el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1.

La aplicación de este método pretende, por un lado, el estudio del comportamiento de la nucleoproteína de este insecto.

to frente a disoluciones salinas de variable fuerza iónica con vistas a su fraccionamiento, y, por otro, la investigación de las condiciones que conduzcan a preparaciones de histonas totales en las que se evite al máximo la pérdida total o parcial de algunas fracciones.

Los preparados extraídos con NaCl 0.25M, 0.50M, 0.75M, 1.0M y 2.0M se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. La imagen electroforética del primer preparado exhibió solamente la presencia de débiles bandas de baja movilidad. A esta concentración de NaCl la cromatina permanece sin disociar y sólo se solubilizan proteínas extracromosomales. Esto justifica la conveniencia de lavar la cromatina de Ceratitis con NaCl 0.25M cuando ésta va a ser destinada a aislamiento de histonas totales o sus fracciones. Una situación semejante se ha descrito en el caso de cromatina de timo (Johns y Forrester, 1969 a).

Las imágenes electroforéticas de los preparados extraídos con el resto de las disoluciones de NaCl se muestran en la Figura 6 (A-D). Como puede observarse, con NaCl 0.50M se solubiliza ya algo de histona. Con NaCl 0.75M y 1.0M se extraen en gran proporción las cuatro fracciones identificadas por electroforesis doble (Fig. 6 E) como fracciones 1,2,3,4 y en menor proporción la fracción 5, y algo de proteína no identificada. Por último, con NaCl 2M sólo se extraen restos de fracciones de histonas destacando la fracción 5.

Lo primero que llama la atención es la temprana disociación que muestra la cromatina de Ceratitis capitata, sobre todo con NaCl 0.50M cuya fuerza iónica sólo consigue en otros organismos la disociación de la fracción muy rica en lisina, F1 (Ohlenbusch y col., 1967) que es la mas débilmente unida al DNA. También es de destacar que con NaCl 0.75M y 1.0M prácticamente se disocia el total de las fracciones. Esto puede ser más explicable a causa



de la propia técnica utilizada. En efecto, Murray y col., (1970) observaron que el tratamiento repetido de la nucleoproteína puede extraer fracciones que requerirían mayores concentraciones en un sólo tratamiento. Hay que señalar igualmente la ausencia de la fracción 6, sobre todo teniendo en cuenta que con NaCl 20% es, junto con la fracción 5, la que se extrae en mayor proporción.

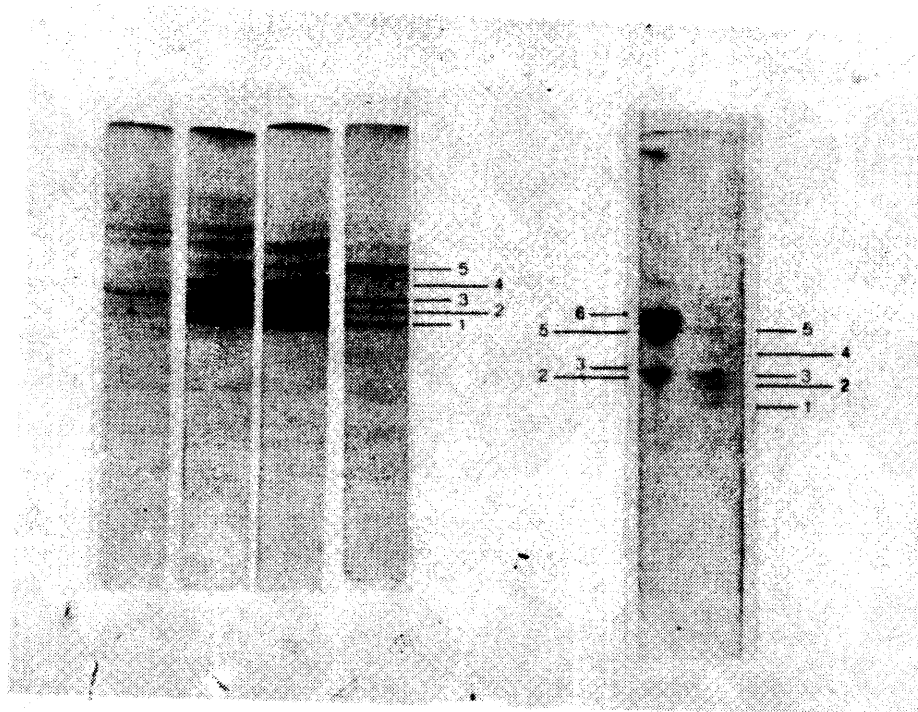
En resumen, la nucleoproteína de Ceratitis capitata parece ser mas fácilmente dissociable que la de otros organismos, pero el método de disociación selectiva con NaCl no extrae ninguna fracción pura. Las fracciones 1 y 4, ausentes en los preparados con NaCl 20%, se extraen en la misma proporción que las fracciones 2 y 3, sin embargo, la fracción 5 se extrae en muy poca proporción y la fracción 6 no aparece en ningún preparado.

A la vista de estos resultados parece claro que este método no es adecuado para fraccionar histonas y no se puede juzgar si lo es para la preparación de histonas totales en tanto se desconozca la identidad de las fracciones. Mas adelante se discute este extremo.

### 3.2.2. EXTRACCION SELECTIVA CON ETANOL-HCl

La extracción de cromatina de timo de ternera con la mezcla etanol-HCl ha permitido el aislamiento selectivo y cuantitativo de las fracciones F2A1, F2A2 y F3 (Johns, 1964 a). La aplicación de esta extracción al caso particular estudiado en este trabajo, ha requerido efectuar algunas variaciones fundamentales sobre el método descrito para timo de ternera.

En los primeros experimentos, la extracción con etanol-HCl se llevó a cabo directamente sobre el homogeneizado del insecto. La homogeneización en etanol 95% y un lavado con el mismo medio fueron así los únicos pasos previos a la extracción (ver



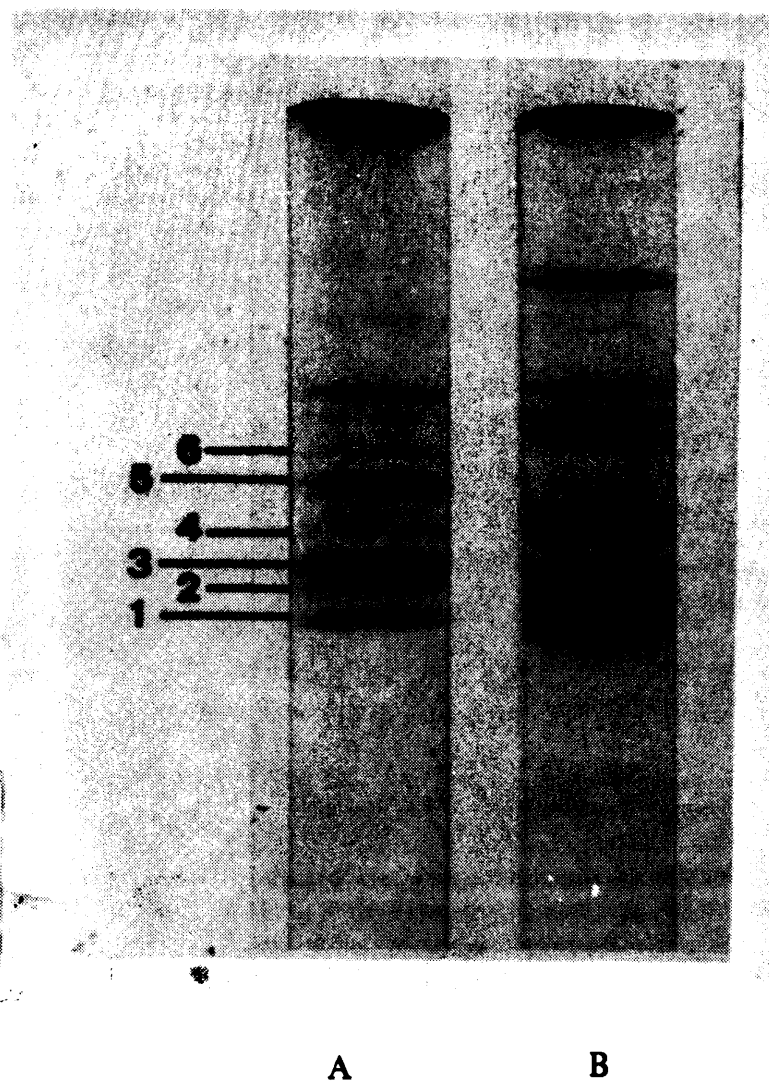
A B C D

E

**Figura 6.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de histonas disociadas de la cromatina cruda de adulto farato de Ceratit<sup>i</sup>s capitata a distintas concentraciones de NaCl. (A) 0.50M, (B) 0.75M, (C) 1.0M, (D) 2.0M. (E) Electroforesis doble de histonas totales de adulto farato de Ceratit<sup>i</sup>s capitata extraídas por disociación salina con NaCl 20% (izquierda) e histonas disociadas con NaCl 0.75M (derecha).

apartado 2.4.2.1.). El material proteico obtenido, presentaba una complicada imagen electroforética, donde aparecía una gran cantidad de bandas de mayor movilidad que las fracciones de histonas, muestra de la presencia de otras proteínas básicas. El aumento del número de lavados con etanol 95% previos a la extracción, no condujo a disminuir estas contaminaciones. La aplicación al material extraído, del proceso adicional de purificación basado en sucesivas disoluciones y precipitaciones que se describe en la sección 2.4.2.1., fue igualmente infructuosa. Hubo pues, que modificar el procedimiento descrito para timo de ternera y la primera modificación aplicada fue la variación de la relación entre los volúmenes de medio de extracción y la cantidad de material sometida al proceso. La valoración de DNA en el homogeneizado, siguiendo el método descrito en el apartado 2.7.1., permitió efectuar distintas extracciones con proporciones de etanol-HCl diferentes; los resultados de estos experimentos no fueron, tampoco, satisfactorios. En las imágenes electroforéticas de la proteína extraída se observaban variaciones en las proporciones relativas de algunas bandas, pero en ningún caso desaparecían las de alta movilidad.

Estas bandas no aparecen en los preparados de histona total obtenidos por extracción ácida o disociación salina de la cromatina cruda. Su detección en los extractos de etanol-HCl del organismo entero llevó a considerar la gran probabilidad de que correspondieran a proteínas extranucleares solubles en el medio de extracción, lo que explicaría su presencia en todos los preparados, fuera cual fuere la relación del volumen de etanol-HCl al material extraído. Estas conclusiones llevaron a la aplicación de un nuevo método, según el cual se procedió, en primer lugar, a la preparación de cromatina cruda siguiendo el mismo procedimiento usado para el aislamiento de histonas totales. La cromatina se lavó con etanol 90% y se sometió a la extracción con etanol-HCl. Los resultados mostraron una total ausencia de las bandas contaminantes de alta movilidad, lo que confirmaba su procedencia extranuclear; sin



**Figura 7.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata preparadas por extracción ácida de la cromatina. (B) Fracciones aisladas por extracción de la cromatina con etanol-HCl.

embargo la extracción no era totalmente selectiva ya que, aunque en diferente proporción, aparecían todas las bandas atribuidas a histonas. De nuevo se procedió a efectuar diferentes extracciones, ahora de la cromatina, con distintas relaciones de volumen de medio a cantidad de DNA en la misma. De esta forma se consiguió determinar una relación óptima entre ambos valores que conducía al aislamiento selectivo de tres de las bandas. Este es el método descrito en el apartado 2.4.2.1., cuyo resultado se caracterizó por electroforesis y aparece en la Figura 7 junto con la histona total de Ceratitidis preparada por extracción ácida de la cromatina. Tras la observación de ambas imágenes se pueden deducir varios interesantes puntos. Así, de las seis bandas que aparecen en la preparación de histonas totales, sólo tres --las numeradas como 1, 2 y 4-- están presentes en el material extraído con etanol-HCl, mientras que las otras tres bandas --3, 5 y 6-- no aparecen en absoluto. Esto permite concluir una gran selectividad de extracción por parte de este procedimiento. Por otro lado, no se detecta ningún tipo de contaminación por materiales de alta movilidad (Fig. 7 B), aunque aparecen, sin embargo, una serie de bandas contaminantes procedentes, seguramente, de proteína no-histona.

En resumen, el tratamiento de la cromatina cruda de adulto farato de Ceratitidis con etanol-HCl conduce a la extracción selectiva de las fracciones de histonas que dan origen a las bandas electroforéticas 1, 2 y 4. El material extraído presenta contaminación por proteína no-histona. Su utilidad como método preparativo o de identificación se discute mas adelante.

### 3.2.3. EXTRACCION SELECTIVA CON ETANOL-CLORURO DE GUANIDINIO

Este procedimiento fue utilizado con éxito para la extracción selectiva de las histonas F2A1 y F2A2 de timo de ternera (Johns, 1967 b). Su aplicación al caso de adulto farato de

Ceratitis capitata requirió efectuar varias modificaciones en el método descrito, de modo semejante a como se ha comentado en el apartado anterior para la extracción con etanol-HCl. Fundamentalmente la proporción óptima de volumen de medio de extracción a cantidad de cromatina hubo de ser determinada a base de efectuar varios procesos de extracción en los que esta relación variase. Los mejores resultados se obtuvieron con las proporciones detalladas en el apartado 2.4.2.2.

La determinación de la cantidad de DNA presente en la cromatina, necesaria para el ajuste de los volúmenes de extracción, se efectuó como se detalla en la sección 2.7.1.

La electroforesis en gel del material extraído produjo la imagen que se muestra en la Figura 8. En ella se observa la presencia de únicamente dos bandas coincidentes en movilidad con las 1 y 2 de histonas totales de extracción ácida (Fig. 8 A). El material extraído no está contaminado por productos de degradación, pero presenta una leve impurificación por bandas de menor movilidad. Es éste, de todas formas, un método de extracción también muy selectivo.

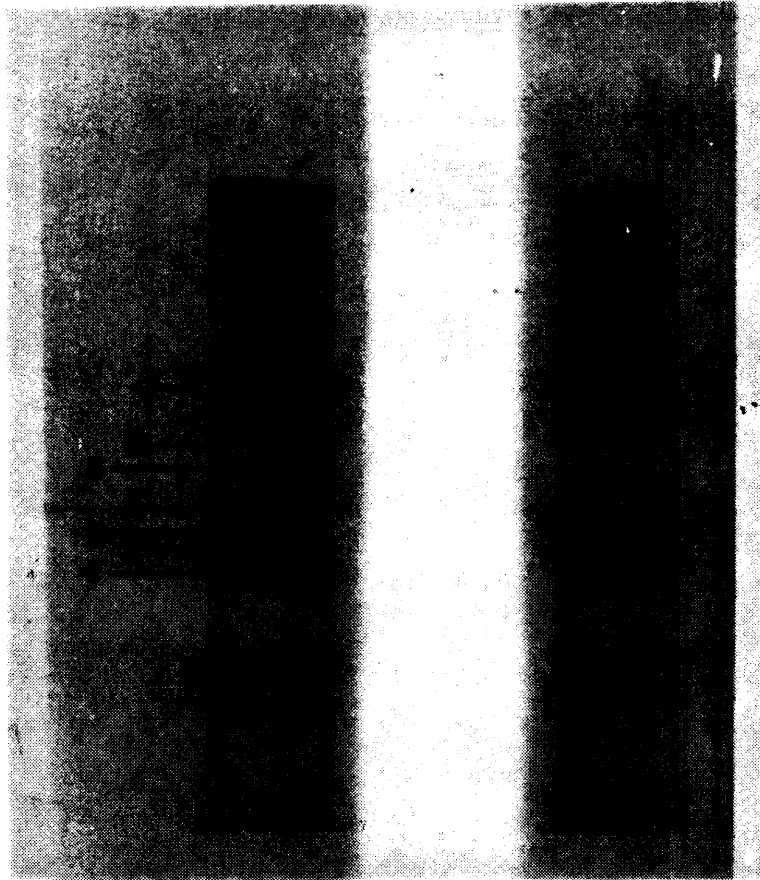
Más adelante se discute sobre la aportación que estos resultados han ofrecido a la identificación de las distintas fracciones. Igualmente se comentará la utilidad que tiene este procedimiento de extracción como método preparativo.

### 3.2.4. DISCUSION DE UNA IDENTIFICACION PROVISIONAL

Los resultados descritos permitieron, en este estado de la investigación, efectuar una identificación provisional de fracciones. Si bien una identificación definitiva requiere la obtención y caracterización de cada una de las histonas presen--

tes, la necesidad de elegir un método adecuado de fraccionamiento para el subsiguiente aislamiento de la fracción F2A1, hizo preciso analizar cuidadosamente los resultados obtenidos en los procesos de extracción total o parcial de histonas con el fin de adscribir de una forma no definitiva, las diferentes fracciones a las bandas que aparecen en las imágenes electroforéticas.

Así, el aislamiento de histonas totales proporcionó algunos resultados sugestivos. Ya se ha descrito (apartado 3.1.3) como la comparación de los métodos de disociación salina y extracción ácida, indujo, en un primer momento, a la elección de este último como procedimiento de preparación de histona total. El alcance que puede tener la ausencia de la banda 1 en las imágenes electroforéticas del material obtenido por disociación salina (Fig. 5) no podía establecerse hasta no conocer la naturaleza del material presente en ella. Sin embargo, la presencia de dicha banda 1 en los extractos de etanol-HCl -método descrito para el aislamiento de las fracciones F2A1, F2A2 y F3- (Fig. 7) y de etanol-cloruro de guanidinio -proceso descrito como selectivo para la extracción de F2A1 y F2A2- (Fig. 8), inducía a la sospecha de que la proteína existente en esta banda fuera alguna de las fracciones principales. Esta sospecha creció al comparar mediante electroforesis doble las movilidades relativas de la histona total de Ceratititis obtenida por extracción ácida y de la histona total de timo de ternera, y comprobar que la banda 1 y la F2A1 de ternera migran igual (Fig. 4 C). La constancia en la secuencia de esta histona entre organismos tan dispares como el guisante y la vaca (DeLange y col., 1969 b), hace suponer que la fracción homóloga en Ceratititis presentará una estructura muy parecida y, por lo tanto, una movilidad electroforética muy semejante. Por otro lado, se conoce la gran tendencia que esta fracción tiene a la agregación (Diggle y Peacocke, 1971), lo que explicaría su ausencia en los preparados de histonas por disociación de la cromatina en NaCl al 20%. Todos estos hechos condujeron a la firme sospecha de que esta banda 1 podía ser la frac---



A

B

**Figura 8.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata preparadas por extracción ácida de la cromatina. (B) Fracciones aisladas por extracción de la cromatina con etanol-cloruro de guanidinio.



ción F2A1 de Ceratitis, y esto llevó a desechar el método de disociación salina como procedimiento para la obtención de preparaciones de histona total que pudieran valer como testigos de referencia en las subsiguientes etapas de fraccionamiento.

Los métodos de fracción selectiva también han hecho interesantes aportaciones a la identificación de fracciones. La posibilidad de que la histona F2A1 esté presente en la banda 1 ya se ha comentado. La imagen electroforética de la preparación de histonas obtenida por extracción con etanol-cloruro de guanidinio (Fig. 8) muestra, además de esta banda 1, la presencia de la banda 2. Cuando este procedimiento de extracción selectiva se aplicó al caso de timo de ternera (Johns, 1967 b) se obtuvieron las fracciones F2A1 y F2A2, lo que llevó a concluir que, si la F2A1 está localizada en la banda 1, muy probablemente la F2A2 sea la fracción que da origen a la banda 2. Este razonamiento viene reforzado por la igualdad de las movilidades electroforéticas de esta banda 2 y de la histona F2A2 de timo (Fig. 4 C).

Por otro lado, la extracción con etanol-HCl, descrita como selectiva para las fracciones ricas en arginina -F2A1, F2A2 y F3- (Johns, 1964 a) condujo, en Ceratitis a una imagen electroforética donde estaban presentes las bandas 1, 2 y 4 (Fig. 7). Sobre la base de que las anteriores suposiciones sean ciertas, se podría identificar, también provisionalmente, la banda 4 con la fracción F3.

La asignación de bandas no podía, por el momento, ir mas lejos. Por lo tanto, los únicos puntos que se pudieron concluir y siempre no de un modo definitivo, fueron la presencia de las fracciones F2A1, F2A2 y F3 en las bandas 1, 2 y 4, respectivamente, lo que implicaría que las histonas ricas en lisina estarían localizadas entre las bandas 3, 5 y 6.

### 3.3. AISLAMIENTO DE F2A1

=====

Tras los buenos resultados obtenidos con la aplicación del método de extracción con etanol-cloruro de guanidinio a la cromatina de adulto farato de Ceratitis capitata, el material de partida para el aislamiento de la histona F2A1 quedaba reducido a una mezcla proteica, cuya imagen electroforética mostraba la presencia de dos bandas -1 y 2-, identificadas provisionalmente como F2A1 y F2A2, y, en mucha menor proporción, la de impurezas por parte de proteína no-histona (Fig. 8).

La obtención de F2A1 requería, pues, el fraccionamiento de esta mezcla, para lo cual se siguieron dos diferentes caminos: precipitación fraccionada del extracto de etanol-cloruro de guanidinio y precipitación fraccionada de la disolución de la mezcla en ácido diluido.

#### 3.3.1. PRECIPITACION FRACCIONADA DEL EXTRACTO ETANOL-GuCl

El procedimiento seguido se describe en la sección 2.5.1. Los precipitados obtenidos por adición de uno y cuatro volúmenes de acetona se identificaron por electroforesis y sus imágenes se muestran en la Figura 9. Como puede verse, en el material precipitado con un volumen de acetona (Fig. 9 A) se encuentra presente la banda 2 y casi la totalidad de la impureza de proteína no-histona, mientras que en el precipitado con cuatro volúmenes (Fig. 9 B) aparece la fracción 1, probable F2A1, acompañada con algo de fracción 2 y una contaminación debida a material de alto peso molecular, posiblemente algún agregado, que apenas penetra en el gel.

Este método presenta por lo tanto una parcial utilidad; si bien no resuelve totalmente la mezcla de fracciones 1 y 2, si consigue eliminar toda la contaminación existente debida a proteína no-histona.

### 3.3.2. PRECIPITACION FRACCIONADA DE DISOLUCION ACIDA

Esta precipitación se efectuó según se describe en la sección 2.5.2. El fraccionamiento a partir de la disolución de ambas histonas en  $H_2SO_4$  no dió buenos resultados. Se varió la concentración de proteína en disolución y, en cada caso, se intentó el fraccionamiento por adición de distintos volúmenes de acetona, pero en ninguna de las condiciones estudiadas, se obtuvo una total separación de ambas fracciones.

Por el contrario la mezcla de ambas histonas sí se pudo resolver mediante precipitación fraccionada con acetona de su disolución en HCl; de todas las condiciones probadas, la mejor separación se obtuvo con el procedimiento descrito en 2.5.2.

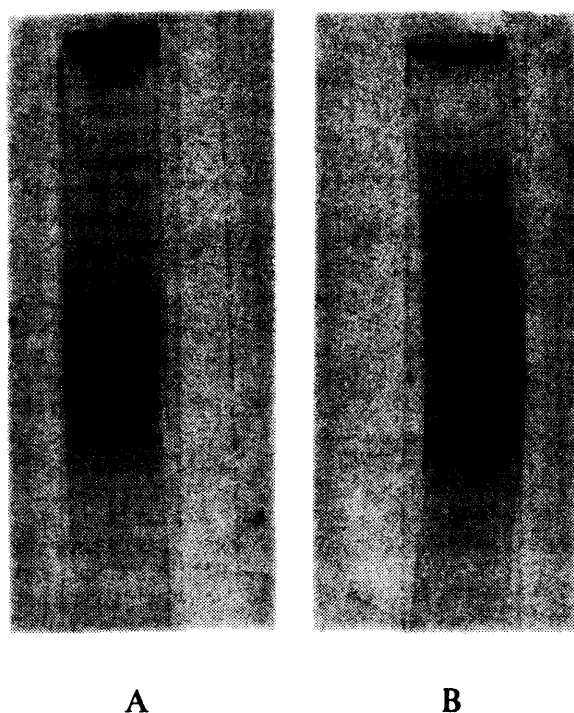
El resultado de este fraccionamiento se muestra en la Figura 10. La imagen electroforética del material precipitado por adición de 2.75 volúmenes de acetona refleja la presencia casi exclusiva de la fracción 1, sólo impurificada levemente por una mínima proporción de banda 2 y acompañada por un material de alto peso molecular que permanece a la entrada del gel. La proteína soluble en este medio, y precipitada por la posterior adición de acetona resulta ser fracción 2 en su gran mayoría, aunque contaminada por proteína no-histona y por productos de degradación de mayor movilidad. También se detecta en este preparado la presencia de pequeñas cantidades de banda 1, no totalmente eliminada en la primera precipitación.



A

B

**Figura 9.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Material precipitado del extracto de etanol-cloruro de guanidinio, por adición de un volumen de acetona. (B) Material soluble en este medio y precipitado por adición de acetona hasta completar cuatro volúmenes.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Material precipitado de la disolución de la mezcla de fracciones 1 y 2 en HCl 0.01N, por adición de 2.75 volúmenes de acetona. (B) Material soluble en este medio y precipitado por adición de acetona hasta completar cuatro volúmenes.

En resumen, la mezcla de histonas 1 y 2 pudo ser fraccionada casi totalmente mediante precipitación con acetona de su disolución en HCl 0.01N; la fracción 1, primera en precipitar se encuentra menos contaminada que la 2, que presenta impurificación por proteína no-histona.

Tras comprobar su eficacia sobre la mezcla de fracciones 1 y 2, este mismo método se aplicó a la fracción 1 cruda obtenida por precipitación fraccionada del extracto de etanol-cloruro de guanidinio (Fig. 9 B). Los resultados de la sucesión de ambos procesos de fraccionamiento se muestran en la Figura 11, donde se aprecia la gran pureza del material precipitado con 2.75 volúmenes de acetona a partir de la disolución de fracción 1 cruda en HCl, no apareciendo en su imagen electroforética ninguna banda de movilidad parecida. Sí se detecta, sin embargo, la presencia de la banda de baja o nula movilidad que viene contaminando todas las preparaciones de esta fracción.

Por lo tanto, con la aplicación sucesiva de ambos procedimientos de precipitación fraccionada, se ha conseguido obtener una histona 1, provisionalmente identificada como F2A1, de un alto grado de pureza. La última etapa de su aislamiento requerirá la eliminación del material de alto peso molecular, única impureza de este preparado.

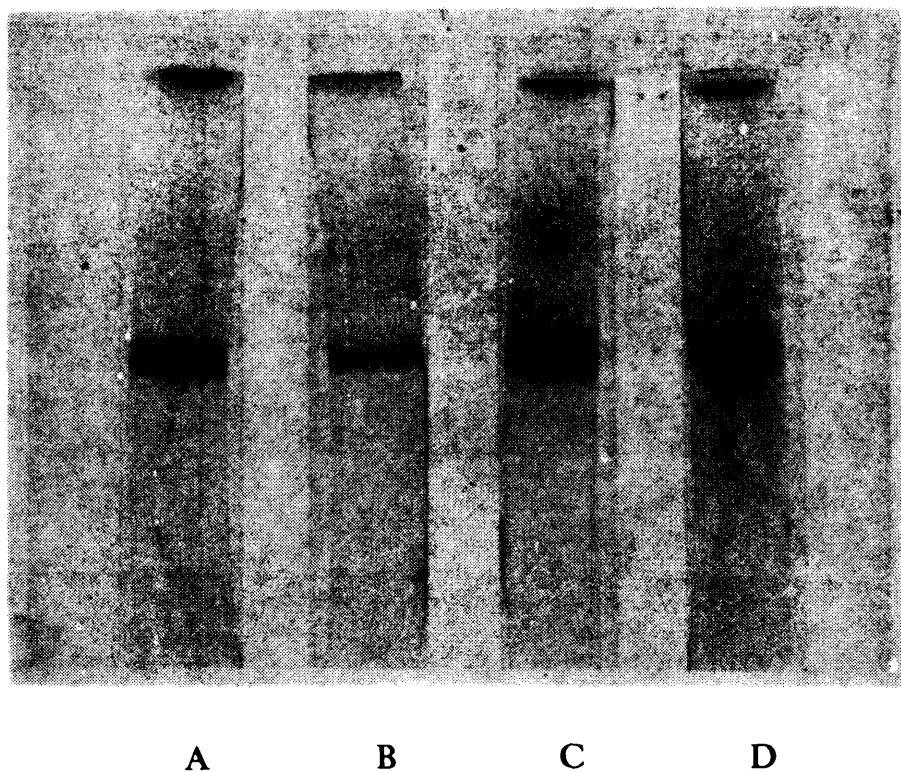
### 3.3.3. PURIFICACION DE F2A1

La eliminación del material de alto peso molecular que aparece impurificando la gran mayoría de los preparados de esta histona, se ha llevado a cabo mediante la aplicación de dos técnicas distintas: electroforesis preparativa y cromatografía en gel.

La electroforesis preparativa se efectuó según el procedimiento descrito en el apartado 2.6.1., y los resultados aparecen en la Figura 12. La imagen electroforética de la proteína que ha atravesado el gel (Fig. 12 C) muestra una gran disminución en la contaminación, pero sin embargo, ésta no ha sido totalmente eliminada. No deja de sorprender el hecho de que este material, que apenas consigue penetrar en el gel en una electroforesis normal de seis horas de duración, aparezca en la imagen electroforética del componente que ha sido capaz de atravesarlo totalmente cuando se duplica el tiempo de desarrollo. La explicación mas plausible sería admitir que este material es un agregado de gran tamaño de la fracción 1. Este punto se comenta mas adelante. Además, aparece, en la imagen de la proteína que atraviesa el gel, una banda de menor movilidad que la banda 1, sobre cuya naturaleza también se especula mas tarde.

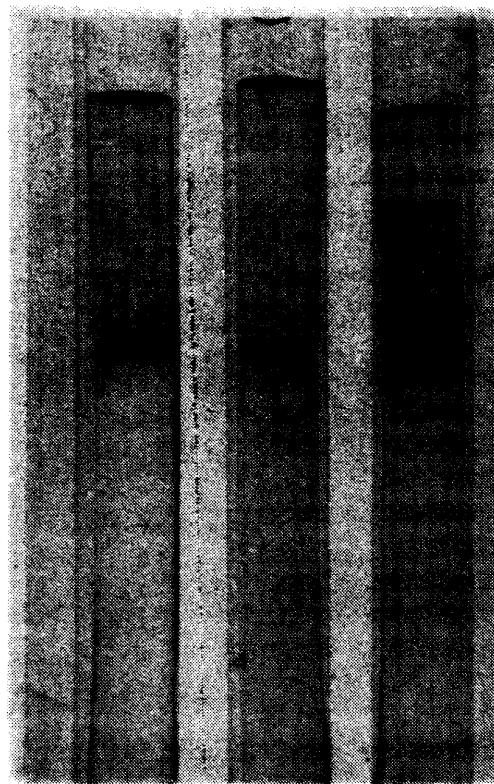
El material fibroso que no consigue penetrar en el gel, y aquél que sólo migra algunos milímetros presentan las imágenes electroforéticas que se muestran en las Figuras 12 B y 12 A respectivamente. Se observa que ambas imágenes son iguales, y que en las dos, además de la impureza de gran tamaño molecular, aparece una banda de idéntica movilidad que la 1. Es este otro dato que apoya la posibilidad de que el material que impurifica los preparados de esta histona, resulte de la agregación de la misma.

La cromatografía en gel se desarrolló como se ha descrito en el apartado 2.6.2. En la Figura 13 se muestra el perfil de elución obtenido. Se observan dos picos muy bien definidos; el primero eluye con el volumen de exclusión de la columna, y estará, en principio, formado por el material de gran tamaño; el segundo pico eluye mas tarde y será, probablemente, la fracción 1 pura. El material proteico presente en cada pico se caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida, y su imagen aparece en la Figura 14. Las suposiciones son correctas y el ma-



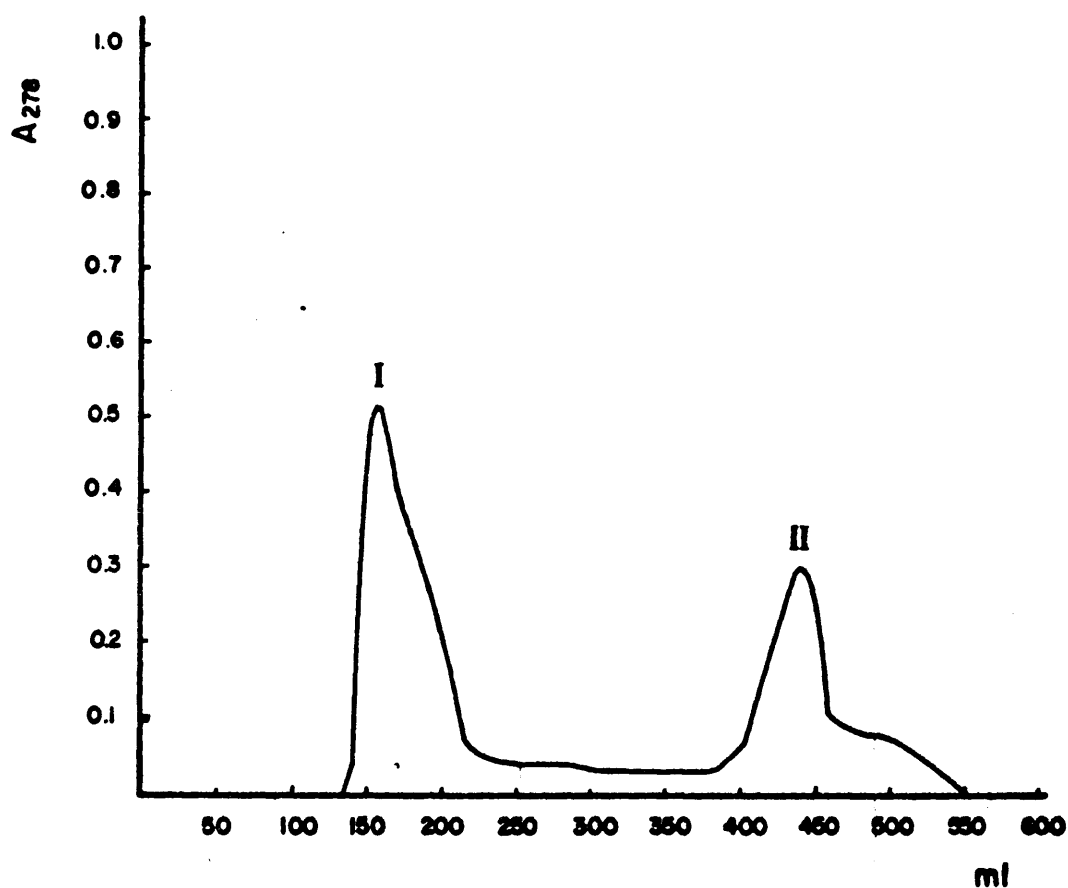
**Figura 11.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Material precipitado de la disolución de fracción 1 cruda en HCl 0.01N, por adición de 2.75 volúmenes de acetona. (B) El mismo material aplicado en el gel en menor cantidad. (C) Fracción 1 cruda. (D) Material soluble en HCl-2.75 volúmenes de acetona y precipitado por nueva adición de acetona hasta completar cuatro volúmenes.



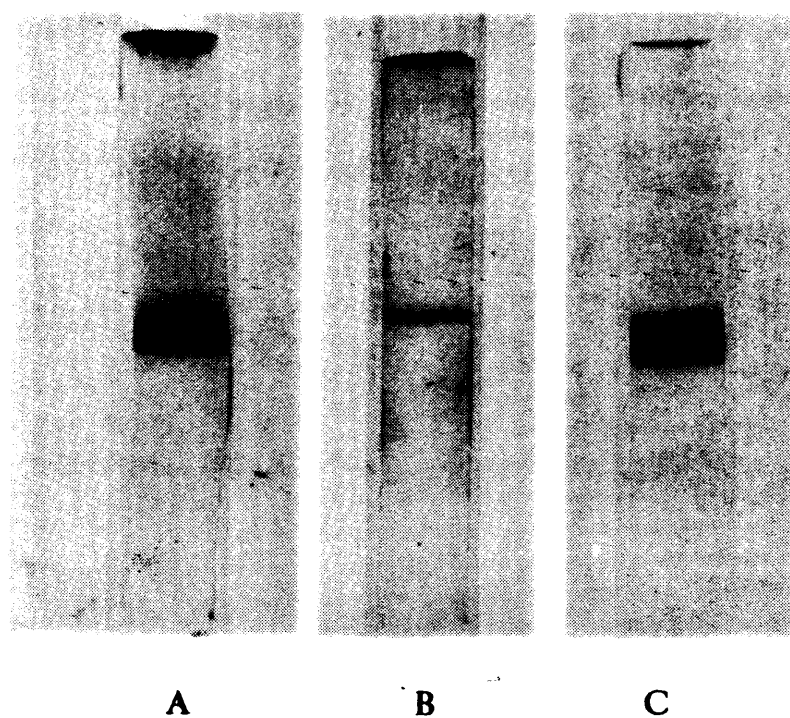


A B C

**Figura 12.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del resultado de la purificación de fracción 1 mediante electroforesis preparativa. (A) Material presente, en el extremo superior del gel. (B) Material presente, en suspensión, en la disolución de ácido acético 0.01N inmediatamente superior al gel. (C) Material que atraviesa el gel.



**Figura 13.** Perfil de elución de la fracción 1 impura, aplicada sobre una columna (1.6 x 100 cm) de Sephadex G-100 y eluída con ácido acético 0.01N. Volumen de las fracciones recogidas: 3.6 ml. Flujo: 30 ml/h.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del resultado de la purificación de la fracción I mediante cromatografía en gel. (A) Fracción I impura. (B) Material presente en el pico I. (C) Material eluido en el pico II.

terial del pico II es fracción 1 totalmente pura, mientras que el del pico I es el compuesto de alto peso molecular. Es interesante observar la presencia de una banda de la misma movilidad que la 1, en la imagen electroforética correspondiente al pico I. No es factible la elución de fracción 1 con el material de este pico, por lo que se puede apuntar, de nuevo, la posibilidad de que este material de gran tamaño, que eluye con el volumen de exclusión en una columna de Sephadex G-100, sea en realidad algún tipo de agregado molecular del que la histona 1 es un constituyente. Esto explicaría la aparición constante de este agregado en todas las preparaciones de fracción 1 y, por otro lado, la presencia de una banda de movilidad igual a la de esta histona, en la imagen electroforética correspondiente al componente de gran tamaño.

La cromatografía en gel, condujo así al aislamiento de la fracción 1 en alto estado de pureza. Al mismo tiempo, esta técnica permitió aislar el componente de alto peso molecular, que fue caracterizado mediante su análisis de aminoácidos. En la Tabla VI se muestra esta composición. Mas adelante se comenta su naturaleza y posible identidad.

#### 3.3.4. DISCUSION GENERAL DEL AISLAMIENTO DE F2A1

La preparación de la histona F2A1 ha planteado serios problemas durante el transcurso de estas investigaciones. Las dificultades debidas a la especial naturaleza del material biológico elegido ya han sido apuntadas al discutir los resultados del aislamiento de histonas totales (apartado 3.1.3). Las estructuras rígidas del insecto, presentes en mas alta proporción en la fase de adulto farato, así como el hecho de trabajar con un organismo completo han complicado en gran manera todo tipo de proceso de extracción.

Por otro lado, la pequeña cantidad de cromatina presente en estos organismos es la causa de los bajos rendimientos conseguidos en las etapas de extracción, rendimiento que resultaba, por otra parte, muy disminuido durante el transcurso del largo proceso de purificación. Este hecho obligó a plantear experimentos de extracción en gran escala y fue, al mismo tiempo, factor decisivo en la elección de los diferentes métodos de extracción, fraccionamiento y purificación empleados. Además, la pequeña proporción de DNA en el insecto, obligó a modificar los procedimientos descritos para otros organismos, lo que hizo necesario efectuar varias pruebas de aproximación en cada caso hasta lograr las condiciones óptimas de extracción.

El aislamiento de histonas totales, para su posterior fraccionamiento, fue desechado a priori como método preparativo de F2A1. Los procedimientos cromatográficos no conseguían sino separar las fracciones ricas en arginina (Johns y col., 1960; Rasmussen y col., 1962; Murray, 1964) y siempre con un rendimiento bajo, inaceptable en una primera etapa de purificación. Los demás métodos disponibles ofrecían aún menos ventajas. Parecía mas interesante iniciar el fraccionamiento desde las primeras etapas del aislamiento, y así se dirigió la investigación hacía los procesos de extracción selectiva de la cromatina cruda.

Se intentó, inicialmente, una extracción selectiva con sales, tratando de aprovechar el hecho del especial comportamiento de la fracción 1, ausente en los preparados de histona total obtenidos por disociación con NaCl al 20%. Sin embargo los resultados no demostraron ningún tipo de selectividad en la extracción (Fig. 6) por lo que el método resultaba totalmente ineficaz con miras a cualquier fin preparativo. Desde luego sus resultados aportaron algunos datos para el conocimiento de la cromatina de Ceratitidis y de su comportamiento frente a medios de distinta fuerza iónica (ver apartado 3.2.1.), así la conveniente

cia de someter a la cromatina a lavados con NaCl 0.25M con el fin de eliminar la contaminación por parte de proteína no-histona. Un comentario aparte merece la disociación aparentemente temprana de la cromatina de Ceratitis.

Se ha descrito recientemente (Wong y Marushige, 1975) la disminución de la fuerza de unión de las histonas en la cromatina de timo, provocada por la presencia de protamina; la fuerza iónica real del medio resulta aumentada por la gran cantidad de cargas existentes en estas proteínas. Estos datos conducen a pensar en los efectos que sobre la disociación de la cromatina de Ceratitis puede tener la presencia de la denominada fracción 5, identificada como proteína específica del pupario (Rojó, 1975) y que presenta un gran número de residuos básicos en su composición. Es muy probable que esta proteína, contribuya a aumentar la fuerza iónica efectiva de las diferentes disoluciones salinas utilizadas, con lo que la aparente facilidad de la cromatina del insecto para disociarse, no sería sino el efecto producido por la presencia de esta fracción 5.

En cualquier caso, la disociación selectiva con sales hubo de ser desechada como método preparativo. Por el contrario, la extracción con disolventes orgánicos ha demostrado ser tan eficaz como en otros organismos. El tratamiento con etanol-HCl condujo a la obtención de tres bandas electroforéticas (Fig. 7) que fueron provisionalmente relacionadas con las fracciones ricas en arginina (ver apartado 3.2.4.). La extracción con etanol-cloruro de guanidio permitió separar sólo dos bandas, identificadas en principio como F2A1 y F2A2 (Fig. 8). Ambos métodos pues, mostraron una alta selectividad en la extracción. Sin embargo, a la hora de adoptar uno de ellos como primer paso conducente al aislamiento de F2A1, no hubo duda en elegir el segundo, desde el momento en que da lugar a una muestra de fracciones mas sencilla.

La siguiente etapa requería, pues, separar ambas fracciones presentes en el extracto etanol-cloruro de guanidinio. La precipitación fraccionada de dicho extracto conducía a una preparación de fracción 2 bastante impurificada por proteína no-histona y que además arrastraba algo de la otra fracción (Fig. 9 A); sin embargo proporcionaba una fracción 1 en donde esta contaminación se encontraba totalmente ausente (Fig. 9 B), por lo que, a pesar de las desventajas causadas por una ligera pérdida de rendimiento y por una mala preparación de la histona 2, se consideró interesante el uso de este procedimiento para la obtención de una fracción 1 cruda, impurificada únicamente por algo de la otra fracción. La eliminación de esta se consiguió mediante un nuevo proceso de precipitación fraccionada, esta vez a partir de su disolución en HCl 0.01N. La preparación de histona 1 así obtenida (Fig. 11) no presenta contaminación alguna a excepción del material que aparece en la parte superior del gel.

La última etapa consistía pues en eliminar este material presente en todos los preparados de histona 1. El gran tamaño que parece presentar, deducción lógica de su movilidad casi nula en electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%, proporciona la base para su eliminación. La electroforesis preparativa (sección 3.3.3.) condujo a resultados que confirmaron lo anteriormente expuesto. La histona consigue atravesar todo el gel de poliacrilamida en un periodo de 12 h., mientras que, en el mismo tiempo, la impureza de gran tamaño no logra sino penetrar en la parte mas superior del gel. Este método adolece sin embargo del inconveniente de admitir muy poca cantidad de material inicial.

La cromatografía en gel no presenta esta desventaja y fue el procedimiento empleado para la purificación de la histona en mayores cantidades. Esta técnica condujo finalmente a la obtención de la histona 1 en alto grado de pureza (Fig. 14).

El material de alto peso molecular se aisló del mismo modo, lo que permitió que su composición de aminoácidos fuera analizada. En la Tabla VI se compara esta composición con la de las fracciones 1, 2 y 4 de Ceratitidis capitata. Puede observarse una serie de importantes diferencias con respecto a la composición de la fracción 1, que anulan la posibilidad de que este material proceda de la autoasociación de esta histona. Así la alta proporción que presenta en aminoácidos ácidos y serina, los superiores valores de prolina y leucina y la baja cantidad de lisina y arginina, lo que conduce a una pequeña relación B/A -0.8- Sin embargo, la presencia de dímeros o tetrámeros cruzados de las distintas fracciones de histonas, tanto en la cromatina intacta, como en los productos de extracción de la misma, resulta cada día mas apoyada por la evidencia experimental. Se ha descrito la formación de un tetrámero  $(F2A1)_2 (F3)_2$  en disolución (Kornberg y Thomas, 1974), y su presencia en la cromatina. D'Anna e Isenberg (1974 d) han estudiado las interacciones de la fracción F3 con las histonas F2A1, F2A2 y F2B, y concluyen la formación de un fuerte complejo entre las fracciones F3 y F2A1, en relación 1:1, verificando su naturaleza de tetrámero. Estos autores presentan, además, un esquema de interacciones entre las cuatro histonas, donde se observa la posibilidad de formación de complejo entre las fracciones F2A1 y F2A2, aunque a este caso se le atribuye una menor fuerza de enlace. Todos estos datos permiten suponer para el material de gran tamaño una naturaleza de agregado molecular, en cuya formación interviene la histona lo que explica la presencia de esta banda en las imágenes electroforéticas de dicho material. Esta fracción 1, estará formando agregado con alguna otra proteína, histona o no, lo que justificaría la presencia de alguna banda distinta de la 1 en los preparados del material de alto peso molecular, como se detecta en alguna de sus imágenes electroforéticas (Fig. 12 C).



T A B L A VI

Composición de aminoácidos del material de alto peso molecular presente en preparados de fracción 1, comparada con las de otras fracciones de Ceratitis capitata.

Aminoácido	Material alto Pm.	Fracción 1	Fracción 2 (1)
Ácido aspártico	9.2	5.5	8.5
Treonina	5.1	6.8	3.4
Serina	5.2	2.4	3.8
Glutámico	11.8	7.2	11.0
Prolina	2.7	tr	1.8
Glicocola	9.0	14.8	9.3
Alanina	8.5	7.4	11.6
Cisteína	-	-	-
Valina	7.9	8.8	7.2
Metionina	tr	tr	1.0
Isoleucina	6.2	5.7	4.8
Leucina	10.1	7.7	11.4
Tirosina	3.1	3.5	2.7
Fenilalanina	3.7	2.4	2.0
Histidina	2.2	2.4	1.6
Lisina	6.8	10.2	10.7
Arginina	8.5	15.3	9.2
B/A	0.8	2.2	1.1
Lys/Arg	0.8	0.7	1.1

(1) López Cano, 1975

### 3.4. CARACTERIZACION DE LA HISTONA F2A1

=====

La fracción F2A1 de Ceratitis capitata se caracterizó mediante análisis de aminoácidos, determinación del residuo N-terminal y determinación de su peso molecular. Los resultados se exponen y discuten a continuación.

#### 3.4.1. COMPOSICION DE AMINOACIDOS

La histona se hidrolizó y su composición de aminoácidos se determinó como se describe en el apartado 2.7.4. Se efectuaron hidrólisis de la proteína a tres diferentes tiempos; los resultados obtenidos para los aminoácidos serina, treonina y tirosina se extrapolaron a tiempo cero, mientras que para valina y leucina, que forman enlaces peptídicos mas resistentes, se tomaron los valores obtenidos tras la hidrólisis mas larga. Para los restantes aminoácidos se tomaron las cantidades medias de los tres análisis. La composición de aminoácidos de la histona F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata se muestra en la Tabla VII, comparada con las de proteínas homólogas de otros organismos deducidas de sus secuencias de aminoácidos ya establecidas. De la confrontación de estos análisis se deducen varias interesantes conclusiones. La primera de ella es, desde luego, la gran semejanza existente entre las composiciones de estas histonas; la constancia de la estructura de esta fracción, a lo largo de la evolución, se refleja de nuevo en el caso de la histona F2A1 del díptero Ceratitis capitata. Y es precisamente este gran parecido, el que permite que las pocas diferencias existentes se definan claramente.

Así, al comparar la F2A1 de Ceratitis con la de timo, se observan diferencias en la proporción de cinco aminoácidos. Aquella tiene un menor contenido en glicocola, inferior en

T A B L A VII

Composición de aminoácidos de la fracción F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata, comparada con la de otros organismos.

Aminoácido	Ceratitis capitata	Timo de ternera (1)	Embrión de guisante (2)	Erizo de mar (3)
Acido aspártico	5.5	4.9	4.9	4.9
Treonina	6.8	6.9	6.9	5.9
Serina	2.4	2.0	2.0	2.0
Acido glutámico	7.2	5.9	5.9	5.9
Prolina	tr	1.0	1.0	1.0
Glicocola	14.8	16.7	16.7	16.7
Alanina	7.4	6.9	6.9	6.9
Cisteína	-	-	-	1.0
Valina	8.8	8.8	7.8	8.8
Metionina	tr	1.0	1.0	1.0
Isoleucina	5.7	5.9	6.9	5.9
Leucina	7.7	7.8	7.8	7.8
Tirosina	3.5	3.9	3.9	3.9
Fenilalanina	2.4	2.0	2.0	2.0
Histidina	2.4	2.0	2.0	2.0
Lisina	10.2	10.8	9.8	10.8
Arginina	15.3	13.7	14.7	13.7
B/A	2.2	2.5	2.5	2.5
Lys/Arg	0.7	0.8	0.7	0.8

Los datos se dan como moles de aminoácidos por 100 moles. Los valores para timo de ternera, guisante y erizo se han deducido de su secuencia de aminoácidos.

(1) DeLange y col., 1969 a

(2) DeLange y col., 1969 b

(3) Strickland y col., 1974

un valor correspondiente a dos restos; igualmente, el valor para la lisina en la histona del insecto, es inferior en un residuo, a la cantidad presente en ternera. Por el contrario, las proporciones de ácido aspártico, ácido glutámico y arginina se encuentran en la fracción de Ceratitis, aumentadas en la cantidad correspondiente a un residuo de aminoácido. Como consecuencia de estas diferencias, la F2A1 de Ceratitis presenta un menor carácter básico -la relación B/A se reduce respecto a timo de ternera- y una relación Lys/Arg también inferior a la de timo. Esta superior proporción de aminoácidos ácidos en insectos ya ha sido descrita por varios autores (Cohen y Gotchel, 1971; Oliver y Chalkley, 1972).

La F2A1 del insecto presenta el mismo número de diferencias al compararla a su homóloga de embrión de guisante, aunque la naturaleza de estas varia. Los cambios en las proporciones de ácido aspártico, ácido glutámico y glicocola son iguales al caso de la comparación con timo, pero las cantidades de lisina y arginina presentes en las F2A1 de Ceratitis y guisante son iguales. Sin embargo estas histonas presentan diferencia en cuanto a su contenido en valina e isoleucina, siendo la proteína del insecto más rica en el primer aminoácido e inferior su proporción del segundo.

Como resultado, la relación Lys/Arg es igual en ambas proteínas, aunque el valor de B/A es de nuevo inferior en la histona del insecto.

La estabilidad de esta fracción a lo largo de la evolución y el conocimiento de su secuencia en proteínas procedentes de organismos tan alejados evolutivamente como el guisante y la vaca, permiten efectuar algunos razonamientos sobre la base de las composiciones de aminoácidos de estas histonas homólogas. Todas las comparaciones efectuadas entre fracciones F2A1 de diferentes procedencias, cuyas secuencias de aminoácidos se

conocen, han conducido a explicar las diferencias en composición sobre la base de sustituciones de algún residuo por otro, pero, en esta fracción, no se conoce ningún caso de desaparición o inclusión de algún aminoácido en la cadena. Esto permite tratar de justificar las variaciones en el caso de la F2A1 de Ceratitis considerando únicamente la posibilidad de sustitución de determinados residuos.

Así, entre Ceratitis y timo de ternera se pueden concluir tres sustituciones: dos residuos de glicocola y uno de lisina, por uno de ácido aspártico, otro de ácido glutámico y un tercero de arginina. Una de las dos variaciones encontradas entre la histona de timo y la de guisante es la sustitución de un residuo de lisina por otro de arginina, sustitución que, por otro lado, no requiere mas que el cambio de una base -adenina por guanina- en el triplete nucleotídico codificador. Es muy probable que esta misma sustitución se haya producido entre timo y Ceratitis. Queda así por justificar la sustitución de dos residuos de glicocola por uno de ácido aspártico y otro de ácido glutámico, cambios también muy factibles ya que sólo afectan a una base. Las variaciones en las correspondientes codones requeridas para estos cambios serían:

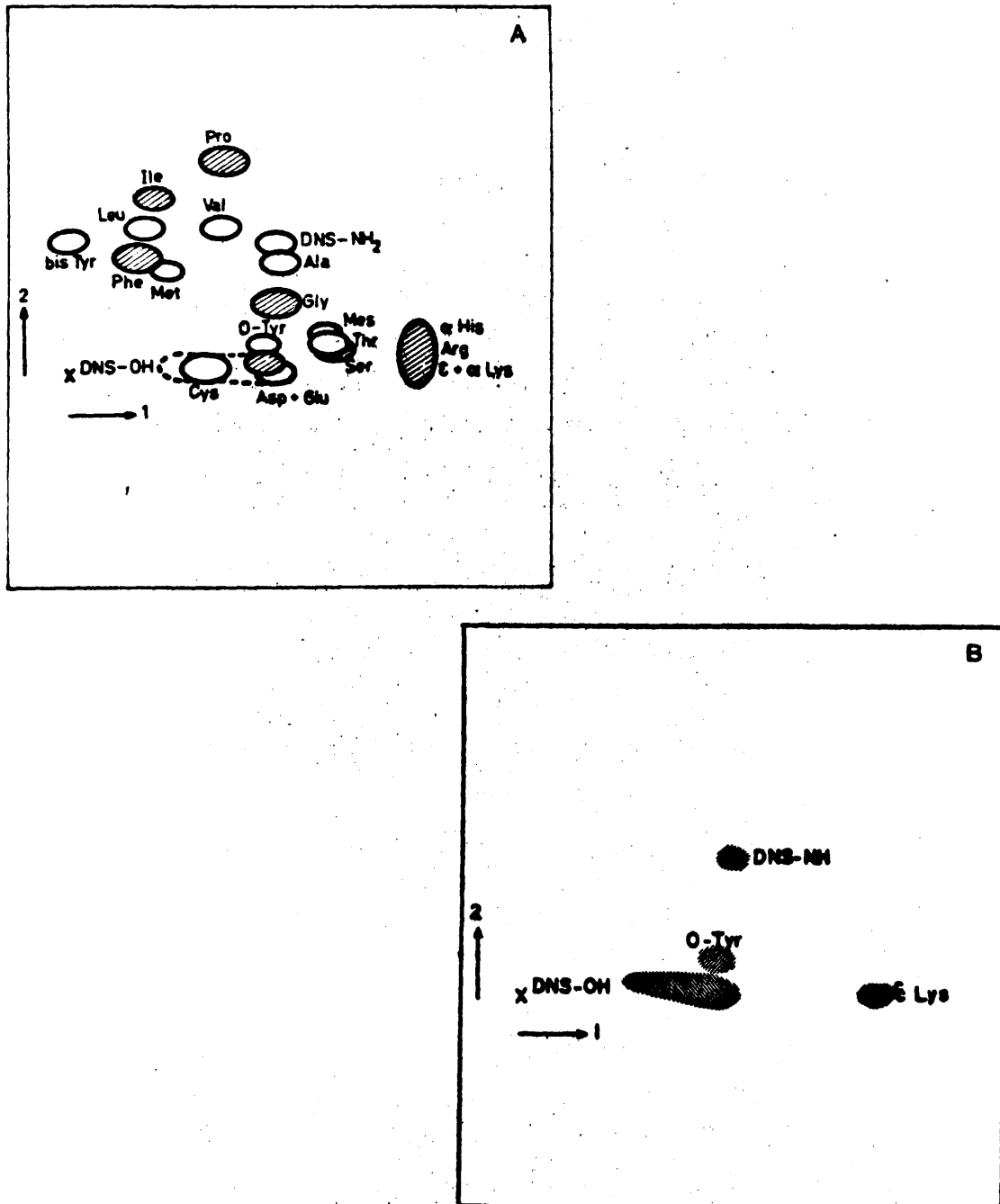
Lys (AAA, AAG)	por Arg (CGX, AGA, AGG)	sustitución de A por G
Gly (GGX)	por Asp (GAU, GAC)	sustitución de G por A
Gly (GGX)	por Glu (GAA, GAG)	sustitución de G por A

Evidentemente, la comprobación de estas sustituciones, y el conocimiento de su exacta naturaleza requiere, previamente, la determinación de la estructura primaria de la histona del insecto. Sin embargo, la claridad de los resultados obtenidos en el estudio comparado de las composiciones de estas histonas homólogas, permite atribuir a estos cambios una alta probabilidad.

### 3.4.2. DETERMINACION DEL RESIDUO N-TERMINAL

El análisis de extremo N-terminal se llevó a cabo utilizando el sensible procedimiento del cloruro de dansilo (DNS-Cl), tal y como se detalla en la sección 2.7.5. La cromatografía bidimensional en capa fina, usando placas de poliamida, condujo a la separación de los dansilderivados. En la Figura 15 A se muestra el cromatograma resultante de la mezcla de los DNS-aminoácidos patrones y los procedentes del tratamiento de la histona; en la Figura 15 B aparece la separación de los DNS-derivados resultantes de la proteína problema. Las manchas presentes en esta última imagen son claramente identificables como DNS-OH y DNS-NH<sub>2</sub>, productos de degradación del reactivo, y como ε-DNS-Lys y O-DNS-Tyr, procedentes de la dansilación de las cadenas laterales de estos residuos situados en posición interna en la histona.

No se detecta, por tanto, la presencia de ningún α-DNS-aminoácido, lo que es indicio de la existencia de un extremo N-terminal bloqueado en esta proteína. La determinación de las secuencias de histonas F2A1 procedentes de otros organismos (DeLange y col., 1969 a, 1969 b; Sautiere y col., 1970, 1971 a, 1971 b; Strickland y col., 1974) ha permitido comprobar la existencia de un residuo de acetil-serina en el extremo N-terminal de todas ellas. Es por lo tanto perfectamente consistente con la admitida estabilidad evolutiva de esta fracción, el hecho de la no detección de ningún DNS-aminoácido procedente de la posición N-terminal.



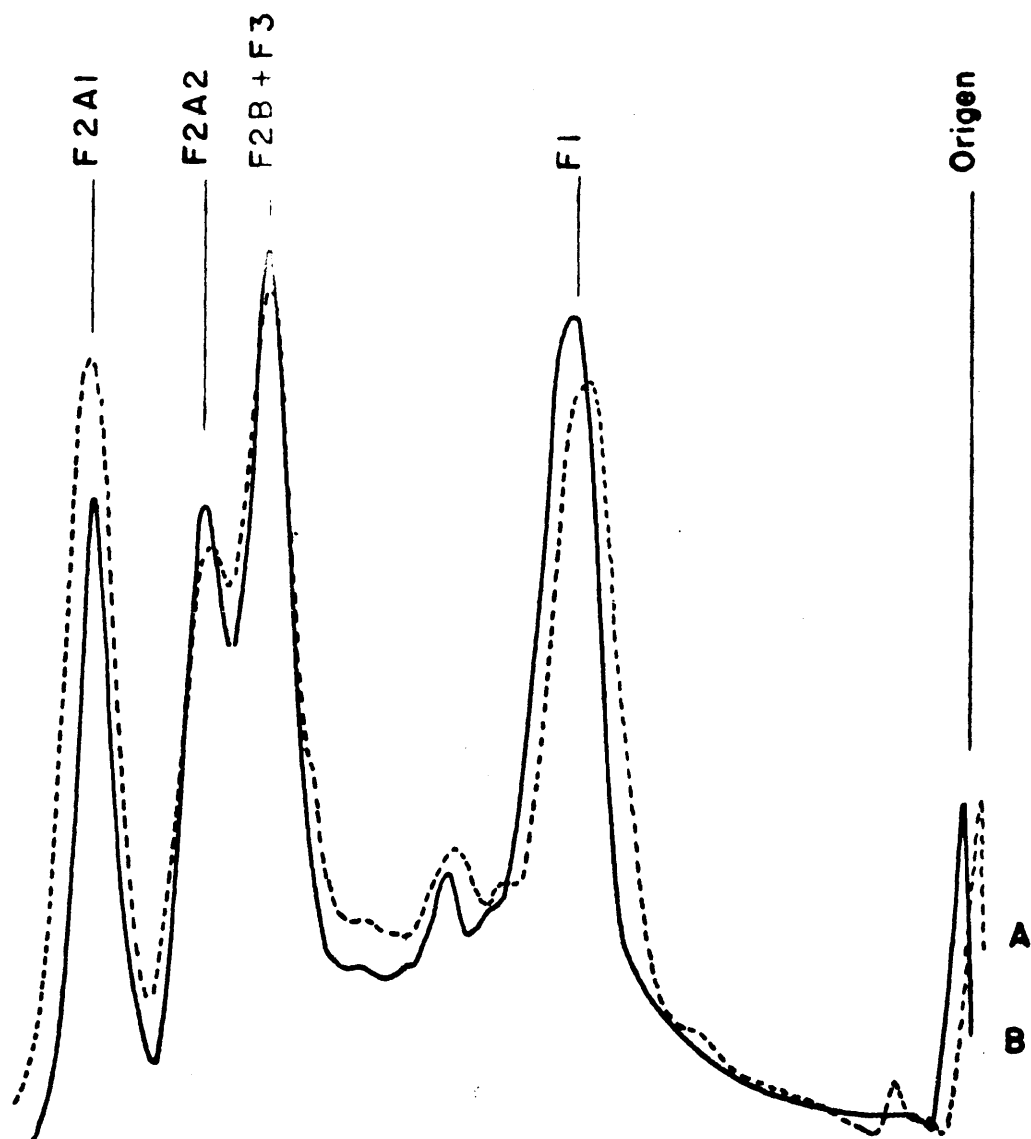
**Figura 15.** Cromatografía de dansilderivados de aminoácidos, en placas de poliamida. (A) Derivados de patrones mas fracción 1. (B) Derivados de fracción 1. Sistemas de desarrollo: (1) ácido fórmico al 1.5% en agua; (2) tolueno-ácido acético glacial (10:1, v/v).

### 3.4.3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

En el apartado 1.4.1. se ha comentado el extraño comportamiento de las histonas en los procesos conducentes a la determinación de su peso molecular, y las posibles explicaciones que se han dado a estos comportamientos.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, ha sido aplicada con éxito a la determinación del peso molecular de la histona F2A1 de Ceratitis, utilizando como patrón histonas de timo de ternera, cuyo peso molecular está perfectamente establecido a partir de los estudios de secuencia. En el apartado 2.7.3. se describe el procedimiento seguido. Se utilizaron dos geles donde se aplicaron, en cada uno, la misma cantidad de histona total de timo, y diferente cantidad de F2A1 de Ceratitis. Una vez desarrollada la electroforésis, los geles se revelaron y densitometraron como se detalla en la sección 2.7.2.1. Las graficas resultantes de este densitometrado se muestran en la Figura 16. En cada una de ellas se observa como la adición de F2A1 de Ceratitis a la histona total de timo no lleva a la aparición de ninguna banda adicional, lo que implica que la fracción del insecto migra exactamente igual que alguna de las fracciones de timo. Además, al comparar ambos perfiles, claramente se detecta el aumento relativo del pico correspondiente a la F2A1 de timo, en aquél gel donde se aplicó una mayor proporción de F2A1 de Ceratitis. Esto concluye de una forma definitiva la identidad en movilidad, y por tanto en peso molecular, de ambas histonas F2A1.





**Figura 16.** Trazados densitométricos de las electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, de histona total de timo mas fracción 1 de Ceratitidis capitata. En A se aplicó una mayor proporción de fracción 1 que en B.

#### 3.4.4. IDENTIFICACION DEFINITIVA DE FRACCIONES

La identificación de histonas se hace normalmente sobre las bases de :

- a) Movilidad electroforética
- b) Solubilidad en distintos disolventes
- c) Composición de aminoácidos

Tras el aislamiento y caracterización de la fracción 1 de Ceratititis capitata, es posible efectuar en los términos anteriores su definitiva identificación como la histona F2A1 del insecto.

Su movilidad electroforética ya se observó igual a la de F2A1 de timo de ternera, cuando las histonas totales de ambos organismos se compararon mediante la técnica de electroforesis doble (Johns, 1969 a) (Fig. 4 C). La electroforesis en SDS aporta un dato definitivo para concluir esta identidad.

Por otra parte, la fracción 1 de adulto farato es soluble en las mezclas etanol-HCl y etanol-cloruro de guanidinio (Fig. 7 B y 8 B), descritas como medios disolventes de la histona F2A1 de timo. La adición de acetona a sus disoluciones provoca su precipitación, del mismo modo que sucede con su homóloga de timo.

Por último, el análisis de aminoácidos de la fracción 1 de Ceratititis es extraordinariamente semejante al de la histona de ternera, como ya se ha discutido (apartado 3.4.1.).

Deducción clara de todos estos resultados es la homología de ambas fracciones, lo que permite concluir la identidad de la fracción 1 con la histona F2A1 de adulto farato de Ceratititis.

Y esta conclusión repercute de forma inmediata sobre la identificación de algunas de las restantes fracciones, ya provisionalmente establecidas. Así, la fracción 2, soluble en etanol-cloruro de guanidinio y de igual movilidad electroforética que la histona F2A2 de timo, puede definitivamente identificarse como su homóloga en el insecto. Y del mismo modo, la fracción 4, soluble en etanol-HCl e insoluble en etanol-cloruro de guanidinio debe tratarse de la F3 de Ceratitis. En este último caso, la movilidad electroforética no es la misma para ambas F3 de Ceratitis y ternera, por lo que la identificación sólo está basada en la solubilidad diferencial de esta fracción en distintos disolventes. Sin embargo, investigaciones complementarias (Rojo, 1975) han corroborado estos datos.

La fracción 2 ha podido purificarse (López Cano, 1975) a partir de la preparación cruda obtenida por precipitación fraccionada del extracto de etanol-cloruro de guanidinio (ver apartado 3.3.1.), y su composición de aminoácidos muestra una gran semejanza con la F2A2 de ternera, dato que viene a confirmar la identificación efectuada.

De esta forma, las tres fracciones 1, 2 y 4 de adulto farato de Ceratitis capitata han podido ser identificadas como las fracciones ricas en arginina, F2A1, F2A2 y F3 respectivamente.

### 3.5. ESTUDIOS CONFORMACIONALES DE LA HISTONA F2A1

=====

La caracterización física y química de la histona F2A1 de adulto farato de Ceratitis (sección 3.4.) ha aportado datos valiosos para el conocimiento estructural de esta proteína. Quizá la conclusión mas sobresaliente, aunque no inesperada, sea

la semejanza que la estructura de esta histona parece tener con la de su homóloga de timo.

Para un estudio mas profundo de esta protefina se abrian dos posibilidades. La primera era la determinación de su estructura primaria. Sin embargo, el esclarecimiento de las secuencias de aminoácidos de varias histonas F2A1 procedentes de organismos muy alejados en la escala evolutiva (DeLange y col., 1969 a, 1969 b; Wilson y col., 1970; Sautiere y col., 1970, 1971 a, 1971 b) había desembocado en la conclusión de una alta constancia para la estructura primaria de esta histona a lo largo de la evolución. Esto restaba interes a esta primera alternativa de la investigación, tanto mas cuanto que el análisis de aminoácidos de la F2A1 de Ceratitis presentaba una extraordinaria semejanza con el de su homóloga en otros diferentes organismos (Tabla VII), lo que auguraba también una alta similitud en sus estructuras primarias.

El otro camino que podía recorrerse en esta investigación implicaba el estudio conformacional de la histona. Desde luego, una semejanza tan acusada en las estructuras primarias de las F2A1 de Ceratitis y ternera conducirá, sin duda, a un parecido del mismo orden en sus estructuras de orden superior, por lo que, en principio, la proximación de las contribuciones de los distintos tipos de estructuras secundarias a la conformacion de esta protefina no presentará más interés que la determinación de su estructura primaria. Sin embargo, esta no es la única vertiente a la que puede dirigirse un estudio conformacional. Mas interesante es, si cabe, la investigación de las variaciones de la conformación de la histona puede sufrir y los motivos que pueden inducir estos cam---bios conformacionales, con el aliciente adicional que representa una aportación directa al estudio de la relación estructura-fun---ción de estas proteínas.

A la vista de los razonamientos anteriores, se decidió llevar a cabo un estudio del comportamiento conformacional de la fracción F2A1 del insecto, utilizando para ello la técnica de dicroísmo circular. Los métodos de estudio de histonas en estado sólido no han demostrado una gran eficacia (ver apartado 1.4.3.1.) en la determinación de estructuras de orden superior en estas proteínas, y, desde luego, no presentan ninguna utilidad como procedimientos de detección de cambios conformacionales. La resonancia magnética nuclear, técnica capaz de detectar pequeñas variaciones en la estructura proteica mediante el estudio del entorno de determinados aminoácidos (apartado 1.4.3.3.), requiere el conocimiento previo de la secuencia de la proteína, por lo que tampoco presentaba utilidad en el caso del presente trabajo.

Sin embargo, la técnica de dicroísmo circular (apartado 1.4.3.2.) ofrecía la posibilidad de estudiar la variación de la conformación de la histona de un modo global, no tan minucioso como la espectroscopía de NMR, pero más útil para un estudio semicuantitativo de la estabilidad conformacional de la histona F2A1 en disolución.

Para ello se hizo necesario establecer que parámetro o parámetros, deducibles del espectro de CD, podrían ser representativos de la conformación de la histona. La situación ideal habría sido poder determinar la composición de hélice  $\alpha$ , estructura  $\beta$  y cadena estadística que la proteína presenta en cada caso. Sin embargo, como más adelante se discute, los métodos descritos para esta determinación adolecen de muchos defectos y conducen a resultados con un gran margen de error. A la vista, por lo tanto, de la imposibilidad de manejar conformaciones absolutas, se decidió referir la estabilidad y el comportamiento conformacionales a un parámetro que fuera suficientemente representativo de ellos. Se eligió la elipticidad por mol de residuo a 222 nm longitud de onda correspondiente a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del enlace peptídico en hélice  $\alpha$ , que, por implicar una considerable rotación de carga,

está caracterizada por una elevada fuerza rotacional (de signo negativo). En esta banda, por otra parte, la contribución de los otros dos tipos de estructura secundaria es escasa.

La investigación se centraba pues, en la determina--ción de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm de la disolu--ción de histona F2A1, y en el estudio del modo como este paráme--tro varía en función de distintas condiciones de la disolución, como fuerza iónica o pH; a partir de los resultados así obtenidos podrá deducirse ciertos datos sobre el comportamiento conformacio--nal de la proteína. El estudio comparado de dos histonas F2A1 pro--cedentes de distintos organismos, y la confrontación de los resul--tados obtenidos para cada una de ellas, multiplicaría el valor de las conclusiones. Por ello, todo el estudio conformacional que a partir de aquí se describe en esta memoria, se ha desarrollado con dos fracciones F2A1; la procedente de adulto farato de Ceratitis capitata, cuyo aislamiento y caracterización ya se han deta--llado, y la histona homóloga de eritrocito de pollo, preparada y caracterizada en los laboratorios del Dr. E. W. Johns y amablemen--te ofrecida para su estudio. La composición de aminoácidos de la F2A1 de eritrocito de pollo se muestra en la Tabla VIII comparada con la de Ceratitis capitata, timo de ternera y embrión de guisan--te, estas dos últimas deducidas de su secuencia de aminoácidos. Claramente se observa una gran semejanza entre la composición de la histona de pollo y la de sus homólogas de otros organismos.

### 3.5.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE HISTONA

Con el fin de poder efectuar comparaciones, los da--tos se hubieron de referir a mol de residuo, lo que requirió una precisa determinación de la concentración de histona en la disolu--ción, valoración que se llevó a cabo espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la disolución a determinada longitud de onda. Entre todos los coeficientes de extinción descritos se esco--

T A B L A VIII

Composición de aminoácidos de la fracción F2A1 de eritrocito de pollo, comparada con la de otros organismos.

Aminoácido	Eritrocito de pollo	Ceratitidis capitata	Timo de ternera (1)	Embrión de guisante (2)
Acido aspártico	5.2	5.5	4.9	4.9
Treonina	6.4	6.8	6.9	6.9
Serina	2.3	2.4	2.0	2.0
Acido glutámico	6.5	7.2	5.9	5.9
Prolina	1.7	tr	1.0	1.0
Glicocola	16.1	14.8	16.7	16.7
Alanina	7.8	7.4	6.9	6.9
Cisteína	-	-	-	-
Valina	8.1	8.8	8.8	7.8
Metionina	1.4	tr	1.0	1.0
Isoleucina	5.3	5.7	5.9	6.9
Leucina	8.3	7.7	7.8	7.8
Tirosina	2.7	3.5	3.9	3.9
Fenilalanina	1.9	2.4	2.0	2.0
Histidina	2.0	2.4	2.0	2.0
Lisina	11.5	10.2	10.8	9.8
Arginina	12.6	15.3	13.7	14.7
B/A	2.2	2.2	2.5	2.5
Lys/Arg	0.9	0.7	0.8	0.7

Los datos se dan como moles de aminoácidos por 100 moles.

Los valores para timo de ternera y guisante se han deducido de su secuencia de aminoácidos.

(1) DeLange y col., 1969 a

(2) DeLange y col., 1969 b

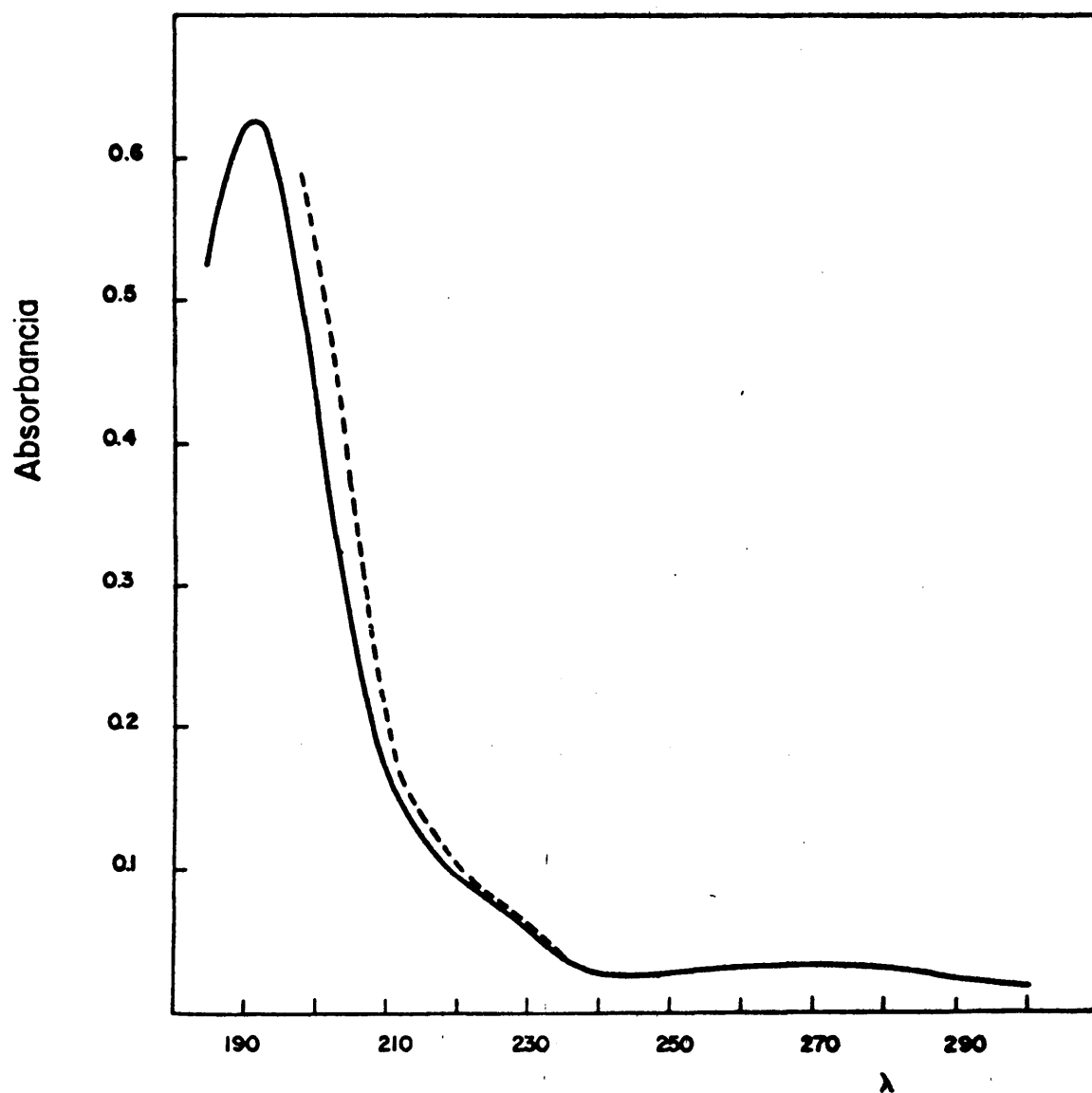
gió el propuesto por Tombs y col., (1959) a 210 nm por considerar se el mas conveniente. A esta longitud de onda la absorción se debe, casi exclusivamente, al enlace peptídico; la contribución de los residuos de aminoácidos aromáticos es mínima y, en cualquier caso, fácil de corregir a partir de los valores de la absorbancia a 227 nm. La contribución de los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptófano es relativamente mayor en otras regiones del espectro; el coeficiente de extinción molar a 190 nm descrito especialmente para la histona F2A1 de timo (Li y col., 1971) no pudo ser aplicado en este caso debido a las exigencias instrumentales que una medición a esta longitud de onda presenta.

La preparación de las disoluciones acuosas de F2A1 y la determinación electrofotométrica de sus concentraciones se efectuaron según se ha descrito en el apartado 2.8.1. En la Figura 17 se muestran los espectros ultravioleta de las disoluciones acuosas de F2A1 de Ceratitidis y de F2A1 de eritrocrito de pollo. A partir de las absorbancias a 210 nm y del valor  $E_{1\text{cm}}^{0.1\%} = 20.5 \pm 0.14$  dl/cm.g. (Tombs y col., 1959) se dedujeron las concentraciones de histona en las diferentes disoluciones.

### 3.5.2. VARIACION DE LA CONFORMACION CON LA FUERZA IONICA

La fuerza iónica de la disolución acuosa de la histona F2A1 se fue haciendo progresivamente mayor, elevando la concentración de NaCl en ella, tal y como se detalla en la sección 2.8.2. Así, la disolución de F2A1 en Tris 0.01M, pH 7.8, se hizo 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.50 y 0.70 M en NaCl; por encima de esta concentración, la precipitación de la histona, motivada posiblemente por su autoasociación, era patente, por lo que la variación de la fuerza iónica se detuvo en ese valor.





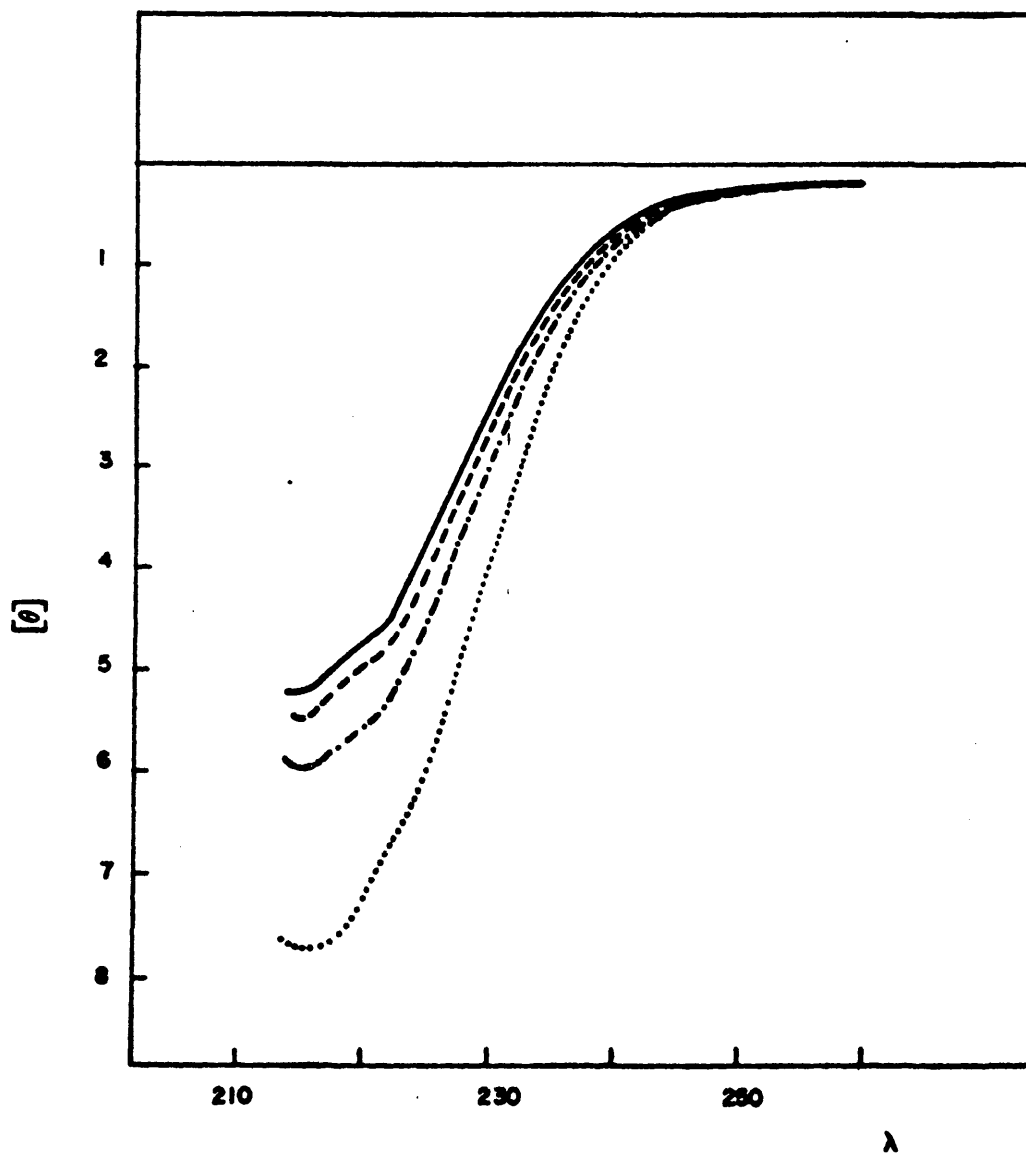
**Figura 17.** Espectros de absorción ultravioleta de disoluciones acuosas de F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata (—) y de eritrocito de pollo (----).

De cada una de esas disoluciones, se obtuvo su espectro de dicroísmo circular, como se describe en el apartado 2.8.4. En las Figuras 18 y 19 se muestran los espectros de CD obtenidos de diferentes disoluciones de F2A1 de Ceratitis y de F2A1 de eritrocito de pollo, respectivamente. A partir de ellos se dedujo el valor de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm utilizando la relación

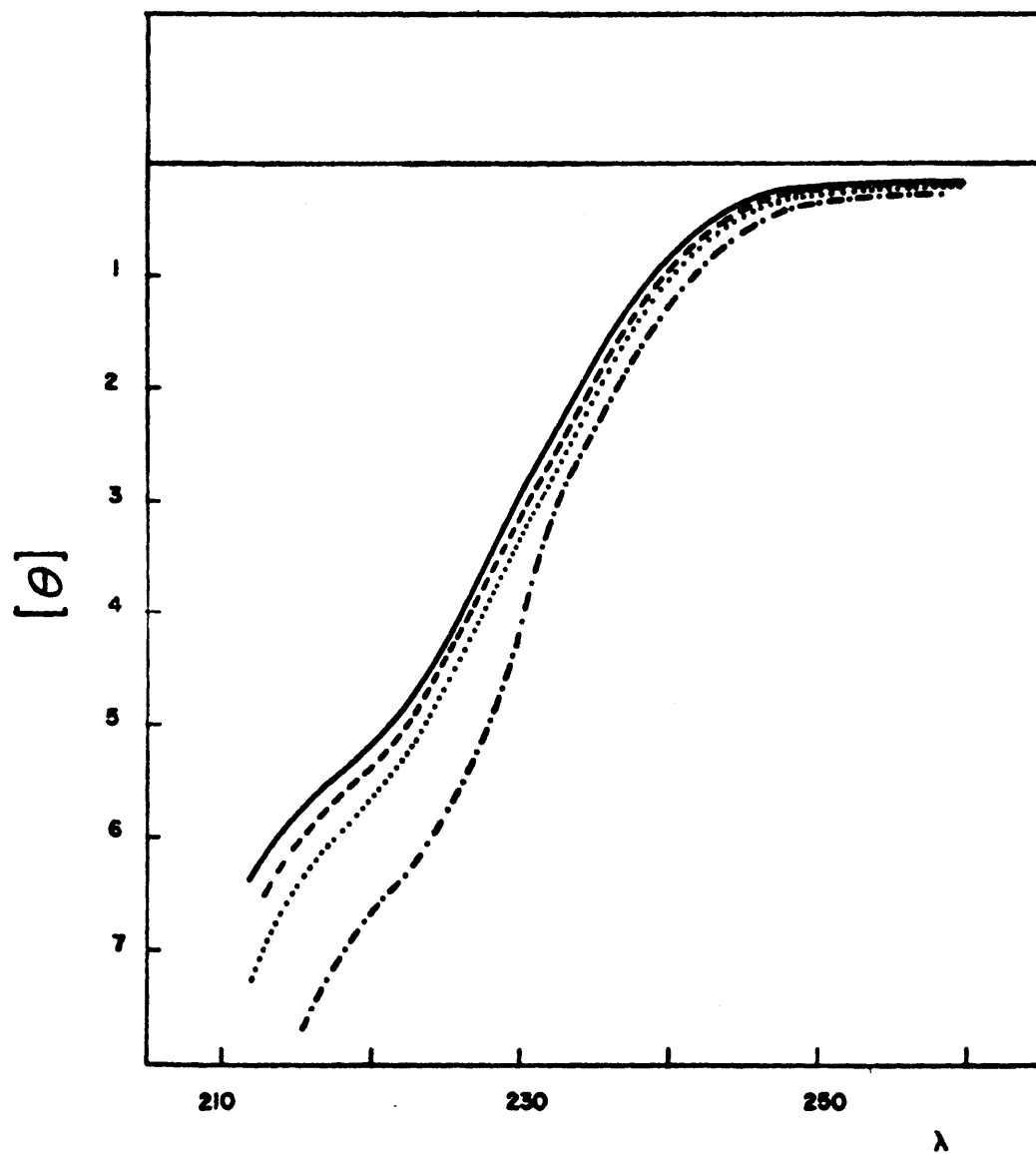
$$[\theta]_{222} = \frac{\theta_{\text{obs}} \times P_{\text{rm}}}{10 \times d \times c} \quad \text{g} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$$

donde  $\theta_{\text{obs}}$  es la elipticidad observada, en grados;  $P_{\text{rm}}$  es el peso molecular del residuo medio, que se tomó igual a 115 g/mol de residuo;  $d$  es el paso de luz en centímetros; y  $c$  la concentración en gramos por mililitro.

En la Tabla IX se muestran los valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo, y el dicroísmo ( $\Delta\epsilon$  ó  $\epsilon_l - \epsilon_d$ ), todos a 222 nm, para cada una de las disoluciones de F2A1 de Ceratitis. La Tabla X recoge los mismos datos para la fracción de eritrocito de pollo. En la Figura 20 aparecen las representaciones gráficas de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm en función del logaritmo de la concentración de NaCl en la disolución para ambas histonas. Puede observarse cómo la elipticidad de la disolución de F2A1 se mantiene constante para concentraciones de NaCl comprendidas entre 0 y 0.05M y cómo, para fuerzas iónicas superiores, la elipticidad aumenta. Este aumento, en principio, sería reflejo de un aumento en la proporción de  $\alpha$ -hélice en la conformación de la histona; sin embargo, a concentraciones de NaCl mas altas, la proteína agrega y precipita, fenómeno descrito para la F2A1 de timo de ternera, (Edwards y Shooter, 1969; Diggle y Peacocke, 1971), y esto conduciría a una disminución de la concentración de F2A1, lo que haría aumentar la elipticidad. El punto exacto donde esta agregación empieza a ocurrir es difi—



**Figura 18.** Espectros de dicroísmo circular de disoluciones acuosas, pH 7.8, de F2A1 de Ceratitis capitata a diferentes concentraciones de NaCl: 0.0M (—), 0.10M (---), 0.20M (-·-·-) y 0.50M (·····).



**Figura 19. Espectros de dicroísmo circular de disoluciones acuasas, pH 7.8, de F2A1 de eritrocito de pollo a diferentes concentraciones de NaCl: 0.0M (—), 0.10M (----), 0.20M (—) y 0.50M (-----).**

T A B L A IX

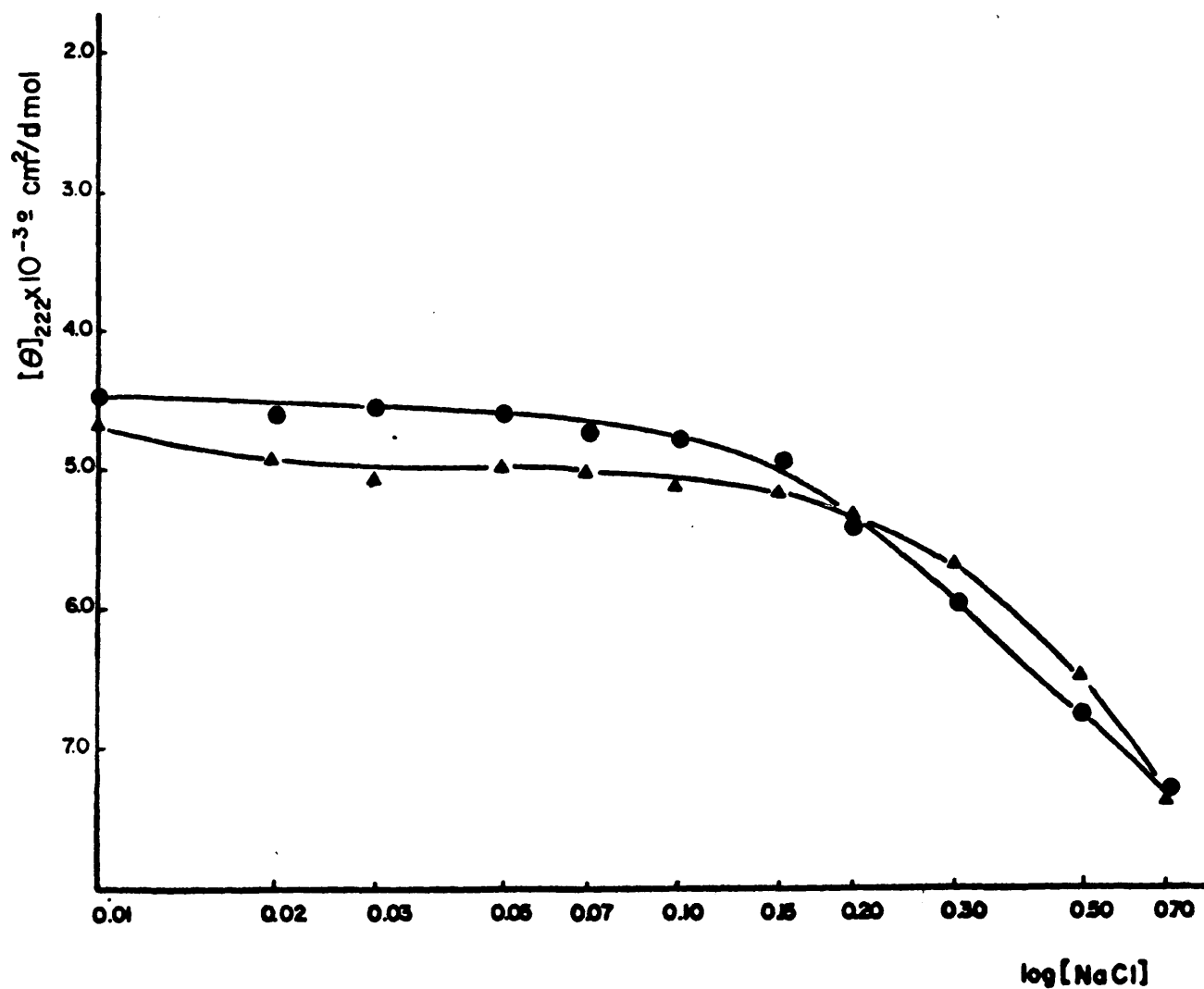
Valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo circular, todos a 222 nm, para las disoluciones de F2A1 de Ceratitis capitata a diferentes concentraciones salinas.

[NaCl] (moles/l)	$\theta_{obs}$ (°)	$[\theta]_{222} \times 10^{-3}$ (°·cm <sup>2</sup> /dmol)	$\Delta\epsilon_{222}$ (l/mol·cm)
0.00	0.0610	4.59	1.39
0.01	0.0580	4.47	1.35
0.02	0.0580	4.59	1.39
0.03	0.0560	4.56	1.38
0.05	0.0560	4.60	1.39
0.07	0.0570	4.74	1.44
0.10	0.0570	4.81	1.46
0.15	0.0580	4.95	1.50
0.20	0.0620	5.37	1.63
0.30	0.0670	5.95	1.80
0.50	0.0720	6.76	2.05
0.70	0.0740	7.36	2.23

T A B L A X

Valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo circular, todos a 222 nm, para las disoluciones de F2A1 de eritrocito de pollo, a diferentes concentraciones salinas.

[NaCl] (moles/l)	$\theta_{obs}$ (°)	$[\theta]_{222} \times 10^{-3}$ (°·cm <sup>2</sup> /dmol)	$\Delta\epsilon_{222}$ (l/mol·cm)
0.00	0.0350	4.66	1.41
0.01	0.0340	4.65	1.41
0.02	0.0350	4.91	1.49
0.03	0.0350	5.06	1.53
0.05	0.0340	4.96	1.50
0.07	0.0340	5.01	1.52
0.10	0.0340	5.09	1.54
0.15	0.0340	5.14	1.56
0.20	0.0350	5.37	1.63
0.30	0.0360	5.66	1.72
0.50	0.0390	6.48	1.96
0.70	0.0420	7.41	2.25



**Figura 20.** Representación gráfica de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm, en función del logaritmo de la concentración de NaCl, para disoluciones de F2A1 de *Ceratitis capitata* (●-●) y de eritrocito de pollo (▲-▲).

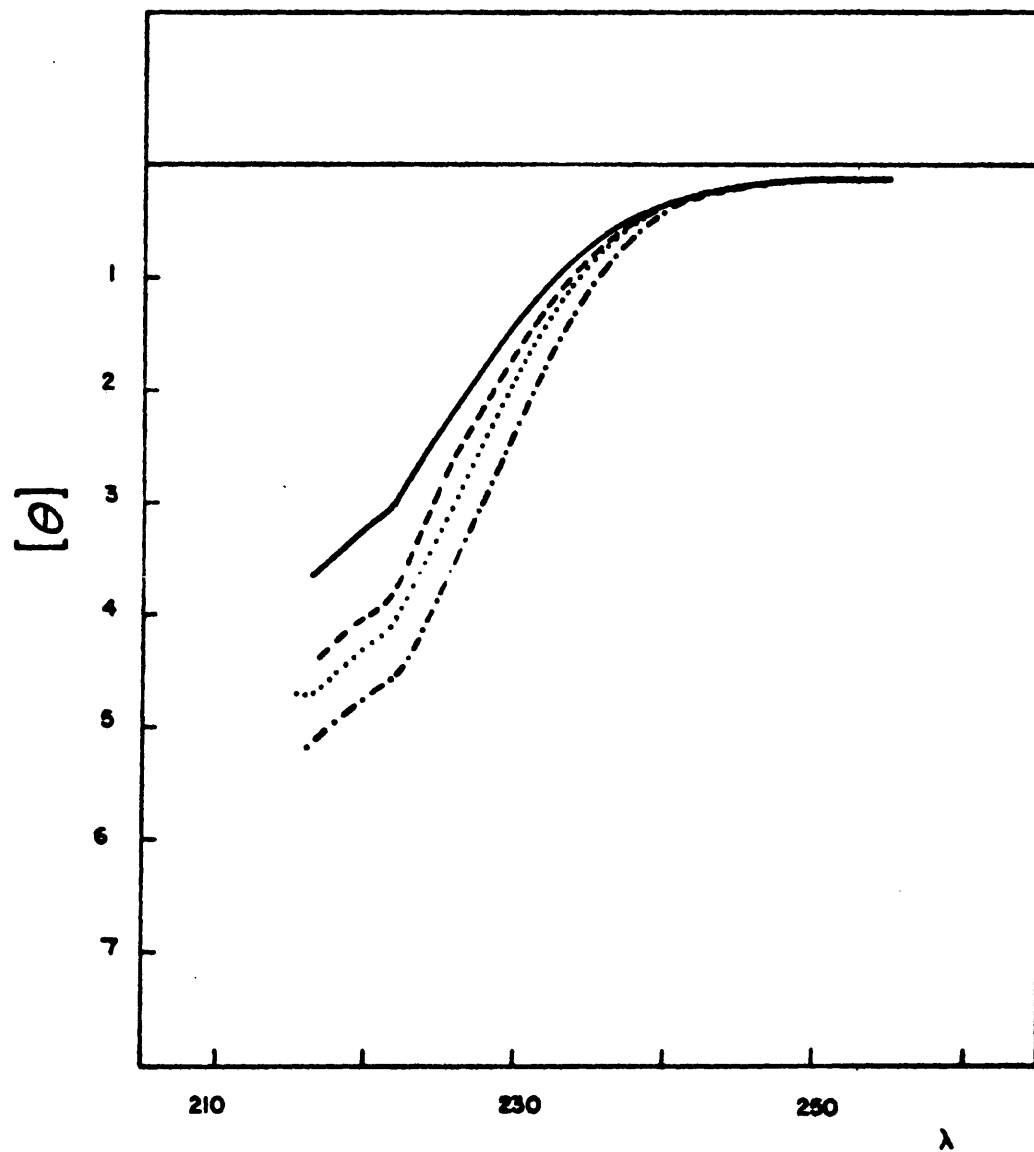
cil de determinar, ya que, aunque la precipitación de la histona sólo comienza a hacerse patente a concentraciones de NaCl superiores a 0.70M, el proceso podría iniciarse a menores concentraciones de sal.

Por otro lado, se observa un marcado paralelismo en el comportamiento de ambas histonas. Las repercusiones de esta semejanza se comentará mas adelante.

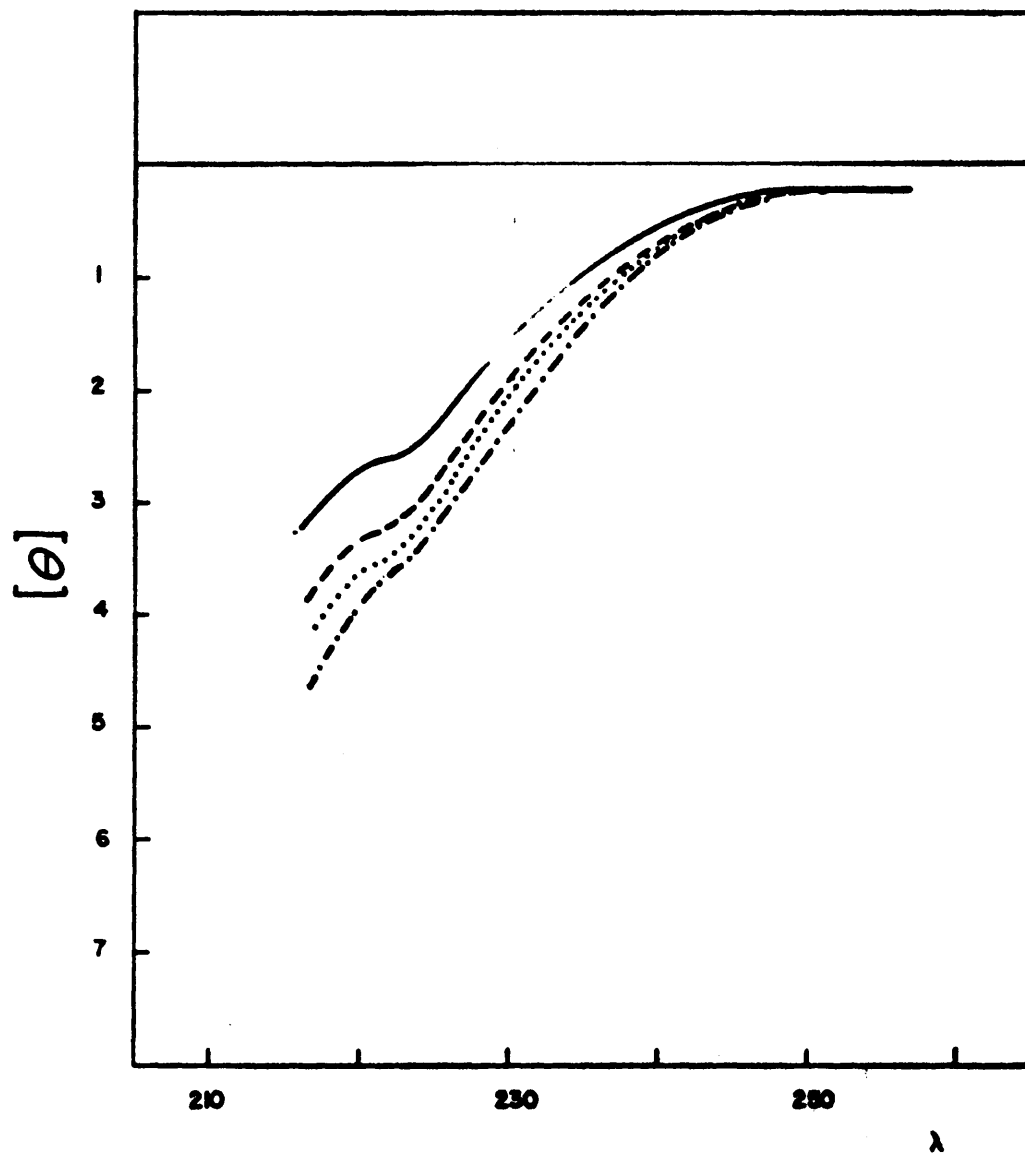
### 3.5.3. VARIACION DE LA CONFORMACION CON EL PH

La variación del pH de la disolución de F2A1 se llevó a cabo según se describe en el apartado 2.8.3. Los espectros de CD se obtuvieron del modo detallado en la sección 2.8.4., y a partir de ellos se dedujeron los valores de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm, como ya se ha señalado (ver apartado 3.5.2.). En las Figuras 21 y 22 se muestran los espectros de CD obtenidos de diferentes disoluciones de F2A1 de Ceratitidis y de F2A1 de eritrocito de pollo, respectivamente. En las Tablas XI y XII aparecen los valores de la elipticidad observada a 222 nm, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo ( $\Delta\epsilon$ ), a la misma longitud de onda, para las disoluciones de F2A1 de Ceratitidis y de pollo, respectivamente. La Figura 23 muestra las curvas obtenidas al representar la elipticidad molar de residuo a 222 nm como función del pH, para las dos histonas. En ella se aprecia como la elipticidad aumenta con el pH hasta un valor de 5.0 para este último. Entre pH 5.0 y 8.0 la elipticidad se mantiene constante para ambas proteínas, y a partir de 8.0 la variación de la elipticidad es irregular, aumentando hacia pH 9.0 e iniciando luego una disminución para valores de pH superiores. El paralelismo entre las gráficas correspondientes a las dos histonas es muy acusado, lo que es reflejo de un comportamiento conformacional semejante; mas adelante se discutirán estos puntos.





**Figura 21.** Espectros de dicroísmo circular de disoluciones acuosas de F2A1 de Ceratitis capitata a diferente pH: 2.0 (—), 4.0 (----), 7.0 (—) y 9.0 (-·-·-·-).



**Figura 22.** Espectros de dicroísmo circular de disoluciones acuosas de F2A1 de eritrocito de pollo a diferente pH: 2.0 (—), 4.0 (-----), 7.0 (.....) y 9.0 (-·-·-·-·-).

T A B L A X I

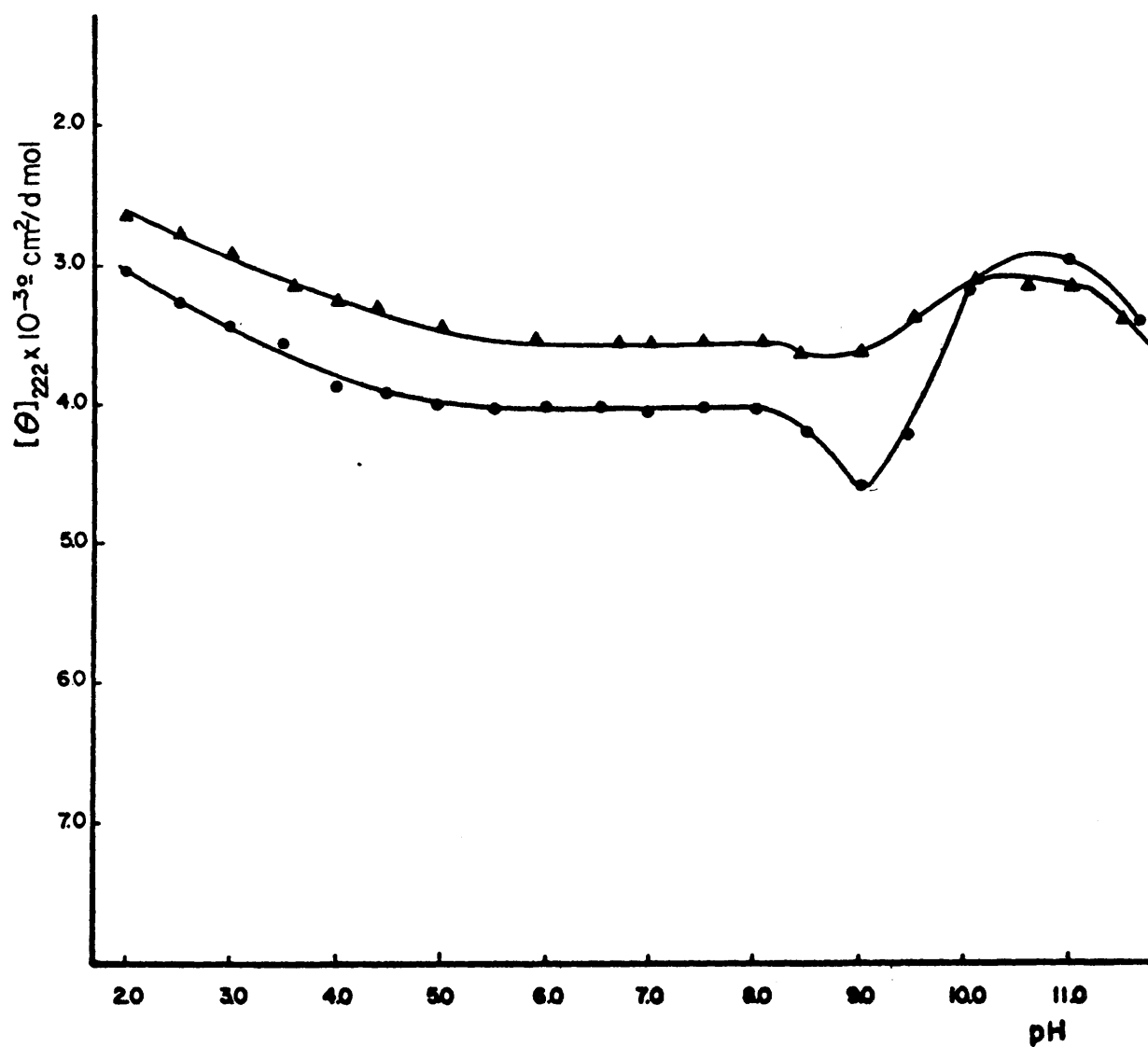
Valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo circular, todos a 222 nm, para las disoluciones de F2A1 de Ceratitis capitata a diferente pH.

pH	$\theta_{obs}$ (°)	$[\theta]_{222} \times 10^{-3}$ (°cm <sup>2</sup> /dmol)	$\Delta\epsilon_{222}$ (l/mol.cm)
2.0	0.0410	3.02	0.92
2.5	0.0440	3.24	0.98
3.0	0.0460	3.39	1.03
3.5	0.0480	3.54	1.07
4.0	0.0520	3.83	1.16
4.5	0.0530	3.91	1.18
5.0	0.0540	3.98	1.21
5.5	0.0540	3.98	1.21
6.0	0.0540	3.98	1.21
6.5	0.0540	3.98	1.21
7.0	0.0550	4.05	1.23
7.5	0.0550	4.05	1.23
8.0	0.0550	4.05	1.23
8.5	0.0570	4.20	1.27
9.0	0.0620	4.57	1.38
9.5	0.0570	4.20	1.27
10.0	0.0430	3.17	0.96
11.0	0.0400	2.95	0.89
11.7	0.0470	3.46	1.05

T A B L A XII

Valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo circular, todos a 222 nm, para las disoluciones de F2A1 de eritrocito de pollo a diferente pH.

pH	$\theta_{obs}$ (°)	$[\theta]_{222} \times 10^{-3}$ (°cm <sup>2</sup> /dmol)	$\Delta\epsilon_{222}$ (l/mol cm)
2.0	0.020	2.62	0.79
2.5	0.021	2.75	0.83
3.0	0.022	2.88	0.87
3.6	0.024	3.13	0.95
4.0	0.025	3.26	0.99
4.4	0.025	3.26	0.99
5.0	0.026	3.39	1.03
5.9	0.027	3.52	1.07
6.7	0.027	3.52	1.07
7.0	0.027	3.52	1.07
7.5	0.027	3.52	1.07
8.0	0.027	3.52	1.07
8.5	0.028	3.65	1.11
9.0	0.028	3.65	1.11
9.5	0.026	3.39	1.03
10.1	0.024	3.13	0.95
10.6	0.024	3.13	0.95
11.0	0.024	3.13	0.95
11.5	0.026	3.39	1.03
12.0	0.029	3.79	1.15



**Figura 23.** Representación gráfica de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm, en función del pH para disoluciones de F2A1 de Ceratitis capitata (●-●) y de eritrocito de pollo (▲-▲).

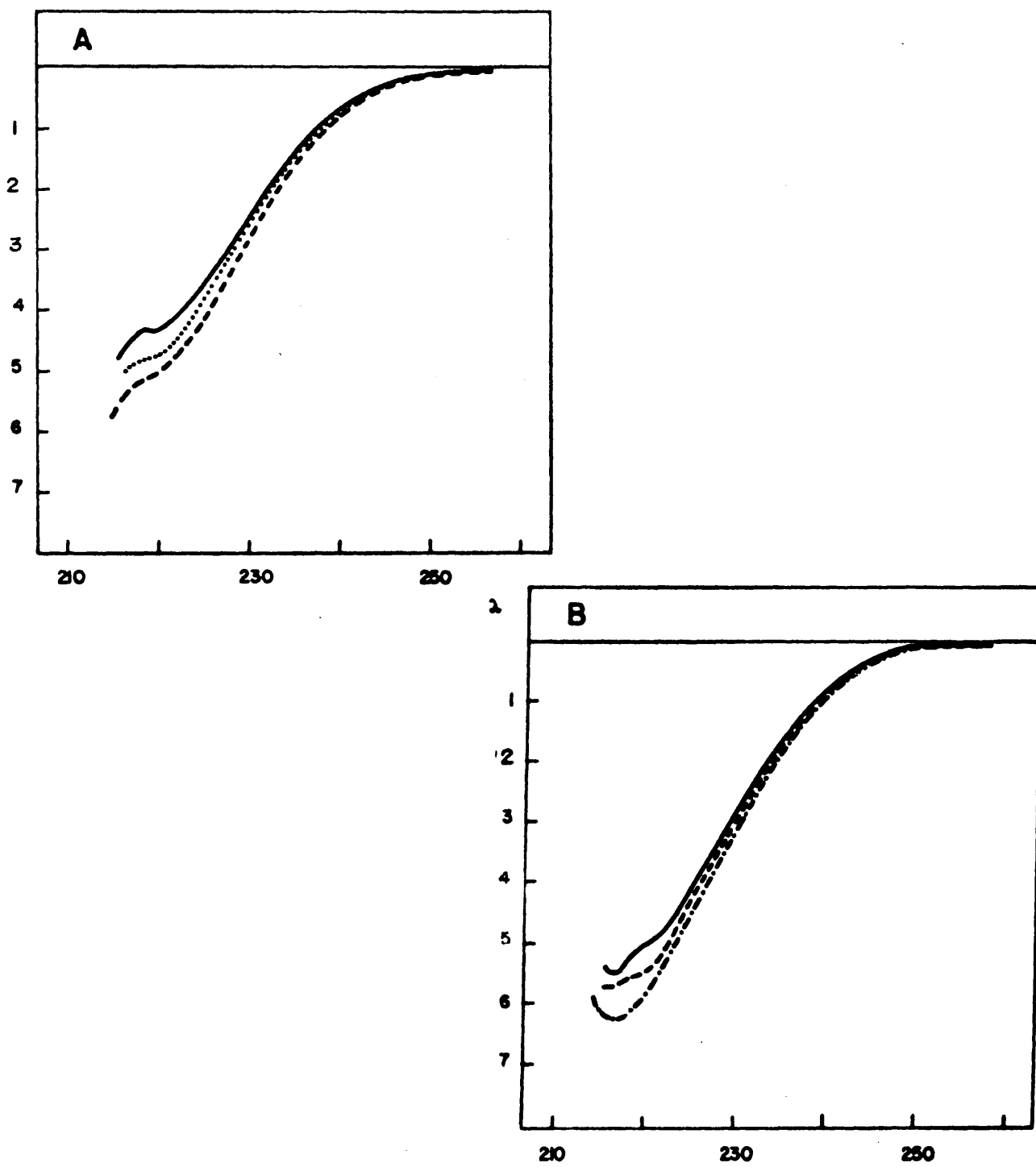
#### 3.5.4. VARIACION DE LA CONFORMACION CON EL TIEMPO

Con el fin de determinar si la conformación de la histona permanece invariable con el tiempo o si, por el contrario, el envejecimiento de la disolución provoca cambios en la estructura de la proteína, se obtuvieron espectros de CD de una misma disolución de F2A1, a diferentes tiempos. Las disoluciones se conservaron a 42° C hasta minutos antes de efectuar la medida, dejándolas a temperatura ambiente en tiempo necesario para que alcanzaran los 22° C  $\pm$  1°, temperatura a la que se obtuvieron todos los espectros de CD.

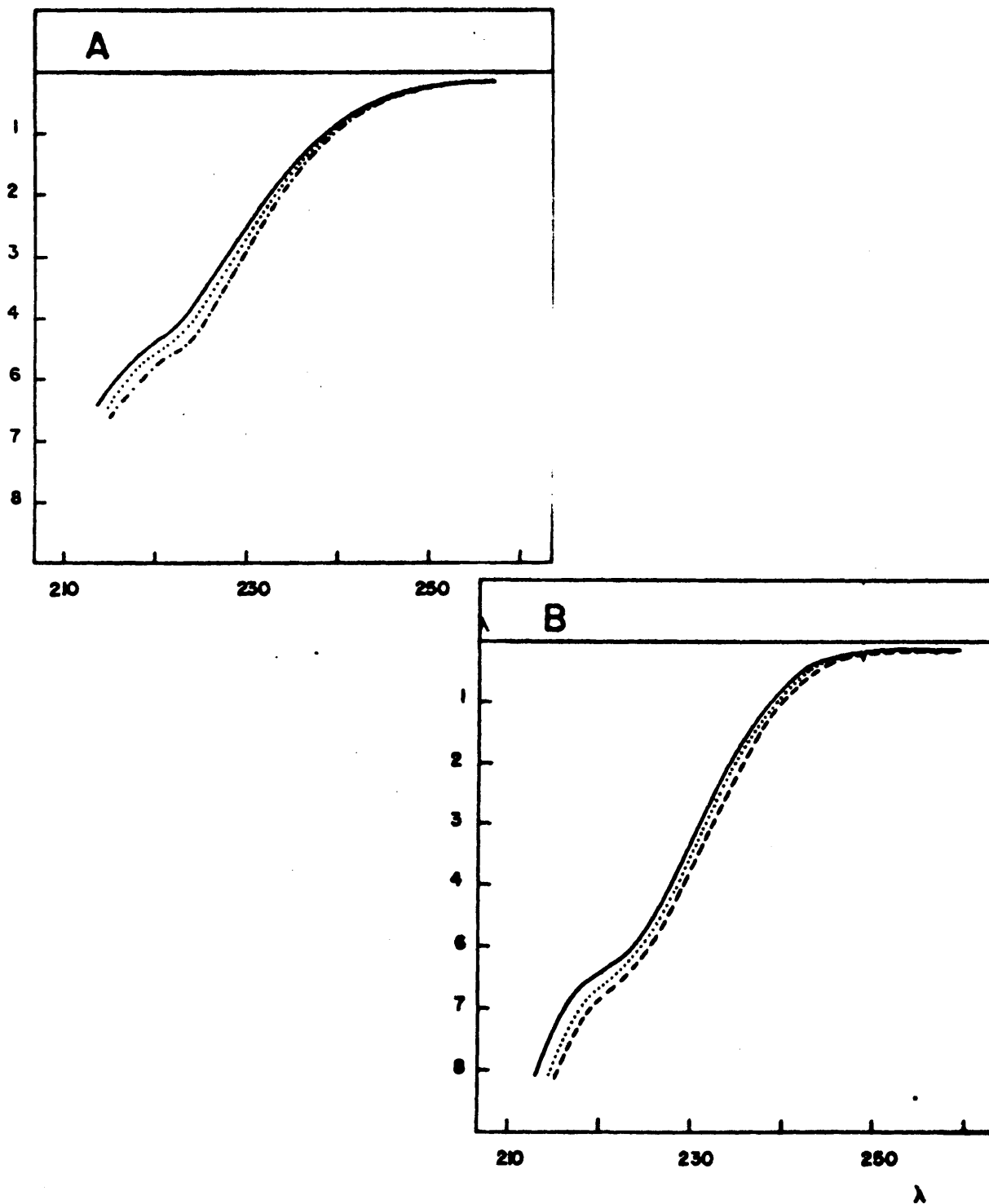
Esta investigación se desarrolló, igual que las anteriores, con la histona F2A1 de Ceratitidis y su homóloga procedente de eritrocito de pollo. En cada caso se estudiaron dos disoluciones de histona en diferentes condiciones de fuerza iónica; una en ausencia de sal, y la otra 0.10M en NaCl. En las Figuras 24 y 25 se muestran los espectros de CD obtenidos a diferentes tiempos de las disoluciones de la histona de Ceratitidis y de pollo, respectivamente.

En la Tabla XIII se muestran la elipticidad, elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo, todos a 222 nm, para las disoluciones de F2A1 de Ceratitidis a distintos tiempos y en la Tabla XIV los mismos datos para las disoluciones de la histona de pollo. La Figura 26 muestra la representación gráfica de la elipticidad por mol de residuo en función del tiempo, para las cuatro diferentes disoluciones estudiadas.

De nuevo, el comportamiento de ambas histonas es extraordinariamente semejante. Para las disoluciones en ausencia de sal, la variación de la elipticidad con el tiempo es algo apreciable, del orden de  $0.5-0.7 \times 10^3$  unidades en cuatro horas.



**Figura 24.** Espectros de dicroísmo circular de disoluciones acuo sas, pH 7.8, de F2A1 de Ceratitis capitata, (A) 0.0M NaCl y (B) 0.10M NaCl, medidos a distintos tiempos: 5 min (—), 30 min (· · · · ·), 120 min (— — — —) y 7.200 min (----).



**Figura 25.** Espectros de dicroísmo circular de disoluciones acuosas, pH 7.8, de F2A1 de eritrocito de pollo, (A) 0.0M NaCl y (B) 0.10M NaCl, medidos a distintos tiempos: 5 min (—), 30 min (-----), 160 min (——) y 2.900 min (-·-·-·-).



T A B L A XIII

Valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo circular, todos a 222 nm, para disoluciones de F2A1 de Ceratitis capitata, medidas a distintos tiempos.

$[NaCl]$ (moles/l)	$t$ (min)	$\theta_{obs}$ ( $^{\circ}$ )	$[\theta]_{222} \times 10^{-3}$ ( $^{\circ}cm^2/dmol$ )	$\Delta\epsilon_{222}$ (l/mol.cm)
0	5	0.0640	4.82	1.46
0	40	0.0640	4.82	1.46
0	80	0.0640	4.82	1.46
0	120	0.0600	4.52	1.37
0	7.200	0.0540	4.06	1.23
0.10	5	0.0630	4.86	1.47
0.10	30	0.0700	5.40	1.64
0.10	60	0.0710	5.47	1.66
0.10	7.200	0.0670	5.16	1.56

T A B L A XIV

Valores de la elipticidad observada, la elipticidad por mol de residuo y el dicroísmo circular, todos a 222 nm, para disoluciones de F2A1 de eritrocito de pollo, medidas a distintos tiempos.

$[\text{NaCl}]$ (moles/l)	t (min)	$\theta_{\text{obs}}$ (°)	$[\theta]_{222} \times 10^{-3}$ (°cm <sup>2</sup> /dmol)(l/mol.cm)	$\Delta\epsilon_{222}$
0	30	0.0350	4.66	1.41
0	160	0.0320	4.26	1.29
0	200	0.0320	4.26	1.29
0	240	0.0300	3.99	1.21
0	2.880	0.0310	4.13	1.25
0.10	30	0.0410	5.61	1.70
0.10	150	0.0400	5.48	1.66
0.10	180	0.0420	5.75	1.74
0.10	215	0.0400	5.48	1.66
0.10	2.880	0.0410	5.61	1.70

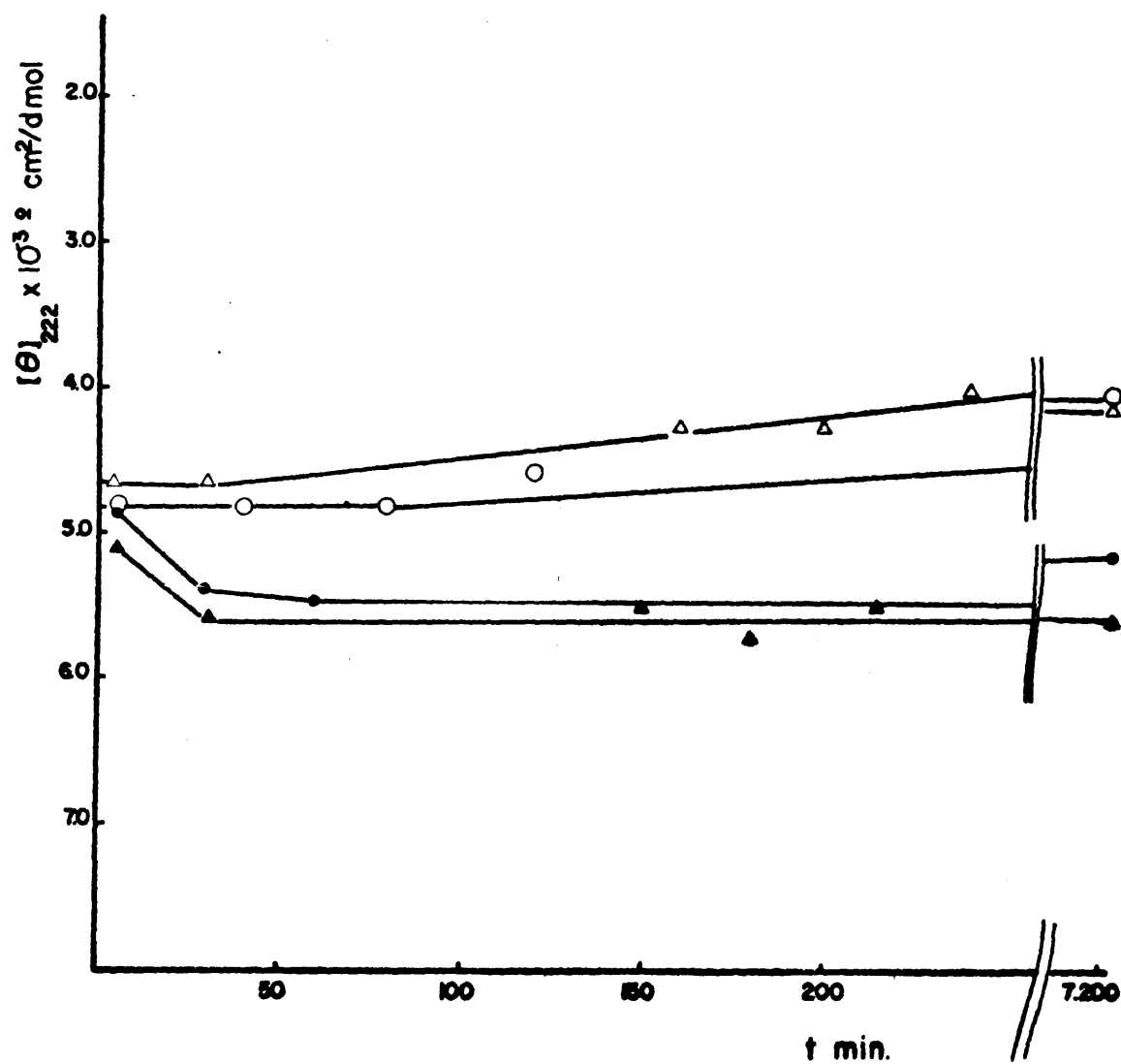


Figura 26. Representación gráfica de la elipticidad por mol de residuo a 222 nm, en función del tiempo para disoluciones de F2A1 de *Ceratitidis capitata*, 0.0M NaCl (○-○) y 0.10M NaCl (●-●), y de eritrocito de pollo, 0.0M NaCl (△-△) y 0.10M NaCl (▲-▲).

Sin embargo se observa un diferente comportamiento de las disoluciones de histona de mas alta fuerza iónica  $-0.10M$  en  $NaCl$ -; en los primeros 30 minutos se detecta un aumento en elipticidad, pero a partir de este tiempo, su constancia es grande, manteniéndose entre un margen de  $0.05-0.10 \times 10^3$  unidades durante mas de cuatro horas.

### 3.5.5. DISCUSION GENERAL DE LOS ESTUDIOS CONFORMACIONALES

Las investigaciones descritas en apartados anteriores permiten extraer conclusiones interesantes acerca de la estabilidad y el comportamiento conformacionales de la histona F2A1 en disolución acuosa.

El aumento en el contenido de estructuras secundarias ordenadas, producido por adición de sales a las disoluciones de histonas, ha sido ampliamente estudiado por muchos investigadores (Bradbury y col., 1965, 1967 a; Jirgensons y Hnilica, 1965; Tuan y Bonner, 1969; Boublik y col., 1970 a; Shih y Fasman, 1971; Li y col. 1971, 1972; Wickett y col., 1972). Igualmente se conoce el hecho de que las histonas agregan bajo diferentes condiciones (Edwards y S; Shooter, 1969; Boublik y col., 1970 a; Diggie y Peacocke, 1971). Los trabajos de Li y col. (Li y col., 1972; Wickett y col., 1972) sobre los cambios conformacionales sufridos por la histona F2A1 de timo de ternera en disolución, inducidos por la adición de distintas sales, han permitido descomponer el proceso total, aparentemente complejo, en un conjunto de etapas mas elementales que pueden ser al menos parcialmente comprendidas. Estos autores concluyen la existencia de dos diferentes cambios conformacionales; a concentraciones de sal suficientemente baja se da sólo un cambio rápido, que conduce a la formación de  $\alpha$ -hélice en un fragmento, probablemente el C-terminal, de la molécula. Sin embargo, existen concentraciones críticas de sal, específicas para cada anión, por encima de las cua

les, tras el cambio rápido, se produce uno mucho mas lento, con adopción de estructura  $\beta$  intercatenaria. Este tipo de interacción intermolecular implicaría la asociación de moléculas de histona, lo que podría explicar la gran agregación observada a altas concentraciones de proteína.

Los resultados obtenidos con las fracciones F2A1 de Ceratitidis capitata y de eritrocito de pollo son totalmente consistentes con la explicación anterior. A bajas concentraciones salinas, la elipticidad por mol de residuo a 222 nm aumenta lentamente con la fuerza iónica (Fig. 20). Este aumento poco pronunciado puede estar perfectamente relacionado con la formación de  $\alpha$ -hélice por similitud con el comportamiento de la histona de timo (Wickett y col., 1972). A concentraciones superiores de NaCl, el aumento de la elipticidad es mas pronunciado; esta segunda mitad de la curva podría responder por un lado al aumento de estructura  $\alpha$ -helicoidal en la histona, y al mismo tiempo a la formación de estructura  $\beta$  intermolecular, proceso que parece ser bastante amplio y que, a concentraciones óptimas de sal, puede llegar a alcanzar aproximadamente el 30% de los residuos de la molécula. (Li y col., 1972). El punto de la curva donde la pendiente cambia bruscamente indica la concentración salina a la que comienza a producirse el cambio conformacional lento, conducente al establecimiento de estructura  $\beta$ . Este punto se ha descrito como específico para cada anión, y el valor que se extrae de los resultados aqui discutidos, ajusta perfectamente a los conseguidos por otros autores (Wickett y col., 1972). A partir de este valor para la concentración de NaCl, la elipticidad aumenta de un modo mas pronunciado; esta forma de la gráfica puede ser reflejo de una alta cooperatividad en el cambio conformacional que lleva a la adopción de estructura  $\beta$ . Los resultados de Wickett y col., (1972) con F2A1 de timo de ternera apuntan igualmente a la existencia de este efecto cooperativo, que puede residir solamente en el cambio estructural de la proteína, y no implicar por tanto que la unión de la sal sea, ella misma, necesariamen

te cooperativa.

De la observación de la Figura 20, puede deducirse un gran parecido en las curvas correspondientes a ambas histonas homólogas, lo que indica un comportamiento conformacional paralelo. Sin embargo, ambas gráficas muestran también alguna diferencia. Así, el punto donde la variación de la elipticidad comienza a hacerse más pronunciada, corresponde a una concentración salina de 0.07-0.10M para la F2A1 de Ceratitidis, mientras que presenta un valor de 0.15M para la otra histona. Este comportamiento ante la fuerza iónica, aparentemente diferente para ambas proteínas, puede interpretarse sobre la base de la distinta concentración de sus disoluciones. En efecto, la constante de velocidad del cambio conformacional lento, depende de la concentración de histona (Li y col., 1972), por lo que la F2A1 de Ceratitidis, más concentrada en su disolución, efectuará más rápidamente la transición que le conduce a adoptar estructura  $\beta$ . El cambio conformacional total, que incluye los cambios rápido y lento, es independiente de la concentración de proteína (Li y col., 1972), pero en el presente caso, los espectros de CD se han obtenido entre cinco y 10 minutos después de la adición de sal y, en muchos casos, no ha dado lugar a que la transición lenta se haya completado. En la Figura 26 se aportan datos que comprueban este hecho. Cuando se aprecian las elipticidades por mol de residuo a 222 nm de las disoluciones de F2A1, medidas a diferentes tiempos, se observa como, para las disoluciones carentes de sal, la elipticidad se mantiene relativamente constante. Sólo se detecta una ligera disminución, achacable a una posible agregación. Pero en las disoluciones de histona en presencia de NaCl 0.10M, se aprecia un aumento en la elipticidad durante los primeros minutos, existente entre las medidas efectuadas cinco y 30 minutos después de la adición de sal, es reflejo del cambio conformacional lento que lleva a la formación de estructura  $\beta$ . Así pues, esta transición lenta es ya apreciable a una concentración 0.10M de sal. Resultado de lo expuesto es que, al obtener los espectros de CD de las disoluciones de concentración salina igual y

superior a 0.10M, el cambio conformacional lento no se habrá completado, y no se detectará mas que el cambio rápido y una fracción de la transición lenta. La fracción de esta transición lenta que se detecte, es función de la constante de velocidad para este cambio, y por lo tanto, la histona del insecto, con mayor constante de velocidad, habrá sufrido un cambio conformacional, a igualdad de tiempo mas extenso que la histona de pollo. Como consecuencia esta última resulta "retrasada" en su gráfica de la Figura 20.

El estudio de la variación de la elipticidad con el pH de la disolución ha contribuido también al conocimiento de la naturaleza conformacional de estas histonas.

En la zona intermedia de la gráfica (Fig. 23), para valores de pH comprendidos entre 5.0 y 8.0, la elipticidad se mantiene constante, lo que refleja una estabilidad en la conformación de ambas proteínas entre dichos márgenes. Cuando el pH desciende la elipticidad disminuye con el, como resultados de una variación conformacional atribuible a una transición de la estructura de algunas regiones de la proteína, desde formas, probablemente  $\alpha$ -hélice, a conformación desordenada de cadena estadística.

La curva adopta una forma mas compleja para valores de pH superiores a 8.0, producto, posiblemente, del solapamiento de distintos procesos.

Las dos histonas F2A1 presentán en su composición una alta proporción de aminoácidos básicos, mayor del 25%, y una relación B/A mayor de 2; pueden considerarse, pues, como policationes, con un punto isoeléctrico superior a 9.0. En la zona próxima a este pH, la desprotonación de los residuos básicos conducirá a un aumento de  $\alpha$ -hélice, eliminada ya la repulsión provocada por tal cantidad de carga positiva en la molécula. Esta podría ser la cau-

sa del aumento en la elipticidad que se inicia para valores de pH superiores a 8.0. Sin embargo, las histonas, insolubles en medios alcalinos, comienzan a precipitar por esta zona de pH, y la aparición de dispersión de luz complica esta última parte de la gráfica.

Las dos F2A1 se comportan de un modo totalmente semejante ante el pH, lo que refuerza mas aún su paralelismo conformacional. La diferencia de elipticidad que existe entre ellas, y que se mantiene constante a lo largo de la gráfica, puede achacarse a un mayor contenido en estructura ordenada por parte de la histona de insecto, y/o al margen de error admitido en la determinación espectrofotométrica de la concentración.

En resumen, ambas histonas presentan un comportamiento conformacional extraordinariamente semejante, respondiendo de modos muy parecidos a las variaciones de pH y fuerza iónica de su disolución acuosa. El crecimiento de ambas variables provoca, en principio, un aumento de la proporción de las estructuras ordenadas en la molécula; la forma de esta dependencia puede explicarse a partir de los datos estructurales conocidos. Por último, el comportamiento de las dos F2A1 estudiadas resulta ser también muy semejante al de su homóloga de timo de ternera.



#### 4. CONCLUSIONES

El objeto del presente trabajo ha sido el aislamiento y purificación de la histona F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata y el posterior estudio de sus propiedades físicas y químicas. A lo largo de estas investigaciones se han obtenido las siguientes conclusiones:

1.- Las histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata pueden obtenerse por dos diferentes métodos: extracción ácida y disociación salina de la cromatina cruda. La extracción ácida conduce al aislamiento de un preparado cuya imagen electroforética en gel de poliacrilamida presenta seis bandas principales, numeradas por orden de movilidad. La disociación salina, por el contrario, conduce a un preparado que sólo contiene las bandas 2, 3, 5 y 6. Las movilidades electroforéticas de las fracciones 1 y 2 son iguales a las de las histonas F2A1 y F2A2 de timo de ternera, respectivamente; las fracciones 5 y 6 migran menos que la histona F1 de timo.

2.- La extracción de la cromatina con disoluciones de NaCl de distinta fuerza iónica no conduce a ningún fraccionamiento selectivo de histonas en Ceratitis capitata. El tratamiento de la cromatina con NaCl 0.25M produce la disociación de proteína no-histona, sin solubilizar ninguna fracción de histona, por lo que el lavado de la cromatina con este medio permite eliminar gran parte

de la proteína no-histona. Las histonas comienzan a disociarse in específicamente a concentraciones de NaCl superiores a 0.50M. Los resultados son comparables a los obtenidos con cromatina de timo de ternera, aunque la disociación total, en adulto farato de Cera titis capitata, tiene lugar a fuerzas iónicas mas bajas. La presencia de una proteína específica del pupario fuertemente básica, como contaminante de la cromatina, puede ser la causa de este diferente comportamiento.

3.- La extracción de la cromatina con etanol-HCl conduce al aislamiento de un preparado cuya imagen electroforética presenta tres bandas, que corresponden a las fracciones 1, 2 y 4. Para este fraccionamiento selectivo, es necesario utilizar una proporción de 100 ml de medio de extracción por cada 20 mg de DNA presentes en la cromatina.

4.- La extracción directa del homogeneizado del insecto con etanol-HCl, conduce al aislamiento simultáneo de proteínas básicas extracromosomales que impurifican los preparados de histonas.

5.- Las fracciones 1 y 2 se extraen selectivamente de la cromatina por tratamiento de éstas con etanol-cloruro de guanidinio. Los mejores resultados en la extracción se obtienen utilizando una relación de 100 ml de medio por 20 mg de DNA presentes en la cromatina.

6.- Las fracciones 1 y 2 se separan parcialmente por precipitación fraccionada con acetona del extracto en etanol-cloruro de guanidinio. La adición de un volumen de acetona conduce a la precipitación de la fracción 2; la posterior adición de aceto-

na hasta completar cuatro volúmenes provoca la precipitación de la fracción 1. La imagen electroforética de esta fracción 1 revela la presencia de trazas de la fracción 2 y de un material de alto peso molecular que apenas penetra en el gel.

7.- Las trazas de fracción 2 pueden eliminarse por precipitación fraccionada del preparado crudo disuelto en HCl 0.01N. La proteína precipitada por adición de 2.75 volúmenes de acetona presenta una imagen electroforética donde no se detecta la presencia de fracción 2, aunque sí la del material de alto peso molecular.

La precipitación fraccionada a partir de la disolución del preparado crudo en  $H_2SO_4$  0.1N no introduce mejora alguna en el estado de pureza de la preparación.

8.- La separación del material de alto peso molecular se puede lograr, en primera aproximación, por electroforesis preparativa. Los resultados obtenidos permiten apuntar la hipótesis de que este material es un agregado molecular que contiene fracción 1 y alguna o algunas otras proteínas.

9.- La purificación final de la fracción 1 puede lograrse por cromatografía en columna de Sephadex G-100, equilibrada y eluida con ácido acético 0.01N. El material de alto peso molecular eluye en el volumen de exclusión de la columna, mientras que la fracción 1 lo hace mas tarde. Ambos extremos se han comprobado por electroforesis en gel de poliacrilamida.

10.- El análisis de aminoácidos de la fracción 1 purificada, revela una gran semejanza con la histona F2A1 de organismos superiores, observándose sólo diferencias en las proporciones de cinco aminoácidos cuando se compara con la histona de timo de ternera. Estas diferencias en los contenidos en glicocola, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina, pueden interpretarse como simples sustituciones debidas a otras tantas mutaciones puntuales. Los resultados estan así de acuerdo con la gran constancia evolutiva observada para la histona F2A1.

El residuo N-terminal de la fracción 1 de Ceratitis capitata se encuentra bloqueado, como se demuestra tras su reacción con cloruro de dansilo. Este es otro dato que afirma la semejanza con las histonas F2A1 de organismos superiores, que presentan un extremo N-terminal acetilado.

El peso molecular de la fracción 1, F2A1, de Ceratitis capitata, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico, resulta ser igual al de la histona F2A1 de timo de ternera.

11.- Además de la identificación de la fracción 1 como la histona F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata, el conjunto de resultados obtenidos permite concluir que la fracción 2 corresponde a la histona F2A2 y la fracción 4 a la histona F3 de Ceratitis.

12.- El análisis de aminoácidos del material de alto peso molecular es compatible con la hipótesis previamente establecida acerca de su naturaleza.

13.- La aplicación de la técnica de dicroísmo circular al estudio de la conformación de la histona F2A1 de Ceratitis capitata permite concluir que las variaciones estructurales inducidas por el aumento de la fuerza iónica del medio son paralelas a las que tienen lugar en histonas homólogas de organismos superiores.

14.- La estabilidad conformacional de la histona F2A1 de Ceratitis capitata frente a la variación del pH, estudiada también por dicroísmo circular, es manifiesta en el intervalo de 5.0 a 8.0. Este resultado está de acuerdo con la naturaleza básica de esta proteína.

15.- La variación de la elipticidad por mol de residuo, medida a 222 nm, en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la disolución, hace posible la investigación de la estabilidad estructural de la histona F2A1 de adulto farato de Ceratitis capitata. Dichas investigaciones llevan a concluir la existencia de un cambio conformacional lento en función del tiempo, cambio previamente descrito para la histona homóloga de timo de ternera.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Adler, A.J., Langan, T.A. y Fasman, G.D. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 153, 769

Adler, A.J., Ross, D.G., Chen, K., Stafford, P.A., Woiszwillo, M. J. y Fasman, G.D. (1974) Biochemistry 13, 616

Allfrey, V.G. (1970) en "Aspects of protein biosynthesis" (C.B. Anfinsen, ed.) Parte A, p. 247 Academic Press, N.Y., London

Arnold, E. y Young, K. (1972) Biochim. Biophys. Acta 257, 482

Artman, M. y Roth, J.S. (1971) J. Mol. Biol. 60, 291

Bailey, G.S. y Dixon, G.H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5463

Balhorn, R., Balhorn, M. y Chalkley, R. (1972 a) Develop. Biol. 29, 199

Balhorn, R., Bordwell, J., Sellers, L., Granner, D. y Chalkley, R. (1972 b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1326

Barclay, A.B. y Eason, R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 269, 37

Barrett, I.D. y Johns, E.W. (1974) Biochem. Soc. Transactions 2, 136

Bauer, R.D. y Johanson, R. (1966) Biochim. Biophys. Acta 119, 418

Böhm, E.L., Strickland, W.N., Strickland, M., Thwaites, B.H., van der Westhuyzen, D.R. y von Holt, C. (1973) FEBS Lett 34, 217

Bonner, J., Chalkley, G.R., Dahmus, M., Fambrough, D., Fujimura, F., Huang, R.C., Huberman, J., Jensen, R., Marushige, K., Ohlenbusch, H., Olivera, B. y Widholm, J. (1968), en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., eds) Vol XII B, p 3-65. Academic Press, New York

Boublik, M., Bradbury, E.M. y Crane-Robinson, C. (1970 a) Eur. J. Biochem. 14, 486

Boublik, M., Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C. y Johns, E.W. (1970 b) Eur. J. Biochem. 17, 151

Bradbury, E.M. y Rattle, H.W.E. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 270

Bradbury, E.M., Price, W.C., Wilkinson, G.R. y Zubay, G. (1962) J. Mol. Biol. 4, 50

Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Phillips, D.M.P., Johns, E.W. y Murray, K. (1965) Nature 205, 1315

Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Goldman, H., Rattle, H.W.E. y Stephens, R.M. (1967 a) J. Mol. Biol. 29, 507

Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Rattle, H.W.E. y Stephens, R. M. (1967 b) en "Conformation of Biopolymers" (G.N. Ramachandran, ed.), 2, p. 583. Academic Press, London, N. York

Bradbury, E.M., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Riches, P.L. y Johns, E.W. (1971) Nature (London) New Biol. 233, 265

Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C. y Johns, E.W. (1972) Nature (London) New Biol. 238, 262

Brandt, W.F. (1972) Ph.D. Thesis, University of Cape Town

Brandt, W.F., Strickland, W.N. y von Holt, C. (1974) FEBS Lett 40, 349

Buckingham, R.H. y Stocken, L.A. (1970) Biochem. J. 117, 509

Burnotte, J., Stollar, B.D. y Fasman, G.D. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155, 428

Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315

Bustin, M. y Cole, R.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4500

Bustin, M. y Cole, R.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5291

Bustin, M., Rall, S.C., Stellwagen, R.H. y Cole, R.D. (1969) Science 163, 391

Butler, J.A.V., Power, D.F. y Palau, J. (1967) Biochem. J. 102, 539

Butler, J.A.V., Johns, E.W. y Phillips, D.M.P. (1968) Progr. Biophys. Mol. Biol. (1968) 18, 209

Candido, E.P.M. y Dixon, G.H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3868

Champagne, M., Pouyet, J., Ouellet, L. y Garel, A. (1970) Bull. Soc. Chim. Biol. 52, 377

Chen, H.L. y Craig, L.C. (1972) Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 31, 496



- Cohen, L.H. y Gotchel, B.V. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1841
- Cole, A. (1962) Nature (London) 196, 211
- Crampton, C.F., Moore, S. y Stein, W.H. (1955) J. Biol. Chem. 215, 787
- Cruft, H.J. (1961) Biochim. Biophys. Acta 54, 611
- Castillón, M.P., Catalán, R.E. y Municio, A.M. (1973) FEBS Lett., 32, 113
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1972) Biochemistry 11, 4017
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1973) Biochemistry 12, 1035
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974 a) Biochemistry 13, 2093
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974 b) Biochemistry 13, 2098
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974 c) Biochemistry 13, 4987
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974 d) Biochemistry 13, 4992
- Davison, P.F. y Butler, J.A.V. (1954) Biochim. Biophys. Acta 15, 439
- Davison, P.F. y Shooter, K.V. (1956) Bull. Soc. Chim. Belg. 65, 85
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 61, 1145
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1969 a) J. Biol. Chem. 244, 319

- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1969 b) J. Biol. Chem. 244, 5669
- DeLange, R.J., Hooper, J. y Smith, E.L. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 882
- Denooij, E.H. y Westenbrink, H.G.K. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 608
- Dick, C. y Johns, E.W. (1969 a) Comp. Biochem. Physiol. 31, 529
- Dick, C. y Johns, E.W. (1969 b) Biochim. Biophys. Acta 174, 380
- Dick, C. y Johns, E.W. (1969 c) Biochim. Biophys. Acta 175, 414
- Dische, Z. (1930) Microchemie 8, 4
- Dwivedi, R., Dutta, S. y Bloch, D. (1969). J. Cell Biol. 43, 51
- Diggle, J.H. y Peacocke, A.R. (1971) FEBS Lett. 18, 138
- Edwards, L.J. y Hnilica, L.S. (1968) Experientia 24, 228
- Edwards, P.A. y Shooter, K.V. (1969) Biochem. J. 114, 227
- Elliott, A., Bradbury, E.M. y Zubay, G. (1962) J.Mol. Biol. 4, 61
- Evans, K. Hohmann, P. y Cole, R.D. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221, 128
- Fambrough, D.M. y Bonner, J. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4434
- Fambrough, D.M., Fujimura, F. y Bonner, J. (1968) Biochemistry 7, 575

Fasman, G.D., Shaffhausen, B., Goldsmith, L. y Adler, A.J. (1970) *Biochemistry* 9, 2814

Fasman, G.D., Valenzuela, M.S. y Adler, A.J. (1971) *Biochemistry* 10, 3795

Fernández Sousa, J.M., Municio, A.M. y Ribera, A. (1971 a) *Biochim. Biophys. Acta* 231, 527

Fernández Sousa, J.M., Municio, A.M. y Ribera, A. (1971 b) *Biochim. Biophys. Acta* 248, 226

Folin, O. y Ciocalteu, V. (1927) *J. Biol. Chem.* 73, 627

Franco, L., Johns, E.W. y Navlet, J.M. (1974 a) *Eur. J. Biochem.* 45, 83

Garel, A., Burckard, J., Mazen, A. y Champagne, M. (1972) *Biochimie* 54, 471

Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautiere, P., Kmiecik, D., Loy, O. y Biserte, G. (1975) *FEBS Lett.* 50, 195

Georgiev, G., Ananieva, L. y Kozlov, J. (1966) *J. Mol. Biol.* 22, 365

Gilmour, R.S. y Paul, J. (1969) *J. Mol. Biol.* 40, 137

Gottesfeld, J.M., Calvin, M., Cole, R.D., Igdaloff, D.M., Moses, V. y Vaughan, W. (1972) *Biochemistry* 11, 1422

Gray, W.R. (1972) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., eds) Vol XXV B, p 121-138. Academic Press, New York

Greenaway, P.J. (1971) *Biochem. J.* 124, 319

Greenaway, P.J. y Murray, K. (1971) *Nature (London) New Biol.* 229, 233

- Hamana, K. e Iwai, K. (1971) J. Biochem. 69, 1097
- Harris, S.E. y Forrest, H.S. (1970) Develop. Biol. 23, 324
- Hastings, J.R.B. y Kirby, K. (1966) Biochem. J. 100, 532
- Hatch, F.T. (1965) Nature 206, 777
- Hill, R.J., Pucia, D.L. y Doty, P. (1971) J. Mol. Biol. 61, 445
- Hnilica, L.S. (1964) Experientia 20, 13
- Hnilica, L.S. (1967) Progr. Nucleic Acid. Res. Molec. Biol. 7, 25
- Hnilica, L.S. y Busch, H. (1963) J. Biol. Chem. 238, 918
- Hnilica, L.S. y Bess, L.G. (1965) Anal. Biochem. 12, 421
- Hoare, T.A. (1971) Ph. D. Thesis, Univ. London
- Hooper, J.A., Smith, E.L., Sommer, K.R. y Chalkley, R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3261
- Hsiang, M. y Cole, R.D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2007
- Huberman, J.A. (1973) Annu. Rev. Biochem. 42, 355
- Iwai, K. (1964) En "The Nucleohistones (J. Bonner y P.O.P. Ts'o, eds), p 59. Holden Day, San Francisco, California
- Iwai, K., Shiomi, H., Ando, T. y Mita, T. (1965) J. Biochem. (Tokyo) 58, 312

- Iwai, K., Ishikawa, K. y Hayashi, H. (1970) Nature (London) 226, 1056
- Jirgensons, B. y Hnilica, L.S. (1965) Biochim. Biophys. Acta 109, 241
- Johns, E.W. (1964 a) Biochem. J. 92, 55
- Johns, E.W. (1964 b) en "The Nucleohistones" (J. Bonner y P. Ts'o eds.) p 52, Holden Day Inc. S. Francisco, London, Amsterdam
- Johns, E.W. (1967 a) Biochem. J. 104, 78
- Johns, E.W. (1967 b) Biochem. J. 105, 611
- Johns, E.W. (1968 a) J. Chromatog. 33, 563
- Johns, E.W. (1968 b) J. Chromatog. 34, 429
- Johns, E.W. (1969 a) J. Chromatog. 42, 152
- Johns, E.W. (1969 b) en "Homeostatic Regulators" (G.E.W. Wolstenholme y J. Knight, eds.) p 128. J. and A. Churchill, London
- Johns, E.W. (1971) en "Histones and Nucleohistones" cap. 1 (D.M.P. Phillips ed.) Plenum Press N. Y. London^
- Johns, E.W. y Butler, J.A.V. (1962 a) Biochem. J. 82, 15
- Johns, E.W. y Butler, J.A.V. (1962 b) Biochem. J. 84, 436
- Johns, E.W. y Butler, J.A.V. (1964) Nature 204, 853
- Johns, E.W. y Forrester, S. (1969 a) Eur. J. Biochem. 8, 547
- Johns, E.W. y Forrester, S. (1969 b) Biochem. J. 111, 371

- Johns, E.W., Phillips, D.M.P., Simson, P. y Butler, J.A.V. (1960) Biochem. J. 77, 631
- Johns, E.W., Phillips, D.M.P., Simson, P. y Butler, J.A.V. (1961) Biochem. J. 80, 189
- Johnson, A. y Rothstein (1970) J. Gen. Physiol. 55, 688
- Jones, G.M.T., Rall, S.C. y Cole, R.D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2548
- Kinkade, J.M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3375
- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1966 a) J. Biol. Chem. 241, 5790
- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1966 b) J. Biol. Chem. 241, 5798
- Kornberg, R.D. y Thomas, J.O. (1974) Science 184, 865
- Kossel, A. (1884) Z. Physiol. Chem. 8, 511
- Leaver, J.L., y Cruft, H.J. (1966) Biochem. J. 101, 665
- Leighton, T.J., Dill, B.C., Stock, J.J. y Phillips, C. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 68, 677
- Leng, M. y Felsenfeld, G. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 56, 1325
- Levy, S., Simpson, R.T. y Sober, H.A. (1972) Biochemistry 11, 1547
- Li, H.J. y Bonner, J. (1971) Biochemistry 10, 1461
- Li, H.J., Isenberg, I. y Johnson, W.C. (1971) Biochemistry 10, 2587

Li, H.J., Wickett, R., Morrie Craig, A. e Isenberg, I. (1972) Biopolymers 11, 375

Lindh, N.O. y Brantmark, B.L. (1965) Anal. Biochem. 10, 415

Loeb, J.E. (1968) Biochim. Biophys. Acta 157, 424

Loewus, M.W. (1968) Nature 218, 474

López Cano, G. (1975) Tesina de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Complutense, Madrid

Louie, A.J. y Dixon, G.H. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 1975

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265

Luck, J.M., Cook, H.A., Eldredge, N.T., Haley, M.I., Kupke, D.W. y Rasmussen, P.S. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 65, 449

Luck, J.M., Rasmussen, P.S., Satake, K. y Tsvetikov, A.N. (1958) J. Biol. Chem. 233, 1407

Makino, F. y Tsuzuki, J. (1971) Nature 231, 446

Mauritzen, C.M., Starbuck, W.C., Sarofa, I.S., Taylor, C.W. y Busch, H. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2240

Mazen, A. y Champagne, M. (1972) Biochimie 54, 1273

Miescher, F. (1874) Verhandl. D. Naturforsch Ges in Basel 6, 138

- Mohberg, J. y Rusch, H.P. (1970) Arch. Biophys. 138, 418
- Municio, A.M., Odriozola, J.M. y Piñeiro, A. (1970) Comp. Biochem. Physiol. 37, 387
- Municio, A.M., Odriozola, J.M., Piñeiro, A. y Ribera, A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 248, 212
- Municio, A.M., Odriozola, J.M., Piñeiro, A y Ribera, A. (1972 a) Biochim. Biophys. Acta 280, 248
- Municio, A.M., Odriozola, J.M. y Ramos, J.A. (1972 b) Insect. Biochem. 2, 113
- Munk, P. y Cox, D.J. (1972) Biochemistry 11, 687
- Murray, K. (1964) en "The Nucleohistones" (J. Bonner y P. Ts'o. eds.) p 21 Holden-Day, S, Francisco, London, Amsterdam
- Murray, K. (1966) J. Mol. Biol. 15, 409
- Murray, K. y Milstein, C. (1967) Biochem. J. 105, 491
- Murray, K., Vidali, G. y Neelin, J.M. (1968) Biochem. J. 107, 207
- Murray, K., Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Stephens, R.M., Haydon A.J. y Peacocke, A.R. (1970) Biochem. J. 120, 859
- Neelin, J.M. y Connell, G.E. (1959) Biochim. Biophys. Acta 31, 539
- Neelin, J.M. y Neelin, E.M. (1960) Canad. J. Biochem. Physiol. 38, 555
- Neelin, J.M., Callahan, P.X., Lamb, D.C. y Murray, K. (1964) Can. J. Biochem. Physiol. 42, 1743
- Nelson, R.D. y Yunis, J.J. (1969) Exp. Cell. Res. 57, 311



Nooden, L., van den Braek, H.W.J. y Servall, J.S. (1973) FEBS Lett 29, 326

Ogawa, Y., Quagliarotti, G., Jordan, J., Taylor, C.W., Starbuck, W. C. y Busch, H. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4387

Ohlenbusch, H.H., Olivera, B.M., Tuan, D. y Davidson, N. (1967) J. Mol. Biol. 25, 299

Oliver, D.R. y Chalkley, R. (1972) Exp. Cell. Res. 73, 295

Oliver, D., Balhorn, R., Granner, D. y Chalkley, R. (1972) Biochemistry 11, 3921

Palau, J. y Padros, E. (1972) FEBS Lett. 27, 157

Pallotta, D. y Berlowitz, L. (1970) Biochim. Biophys. Acta 200, 538

Panyim, S. y Chalkley, R. (1969 a) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 1042

Panyim, S. y Chalkley, R. (1969 b) Biochemistry 8, 3972

Panyim, S. y Chalkley, R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7557

Panyim, S., Chalkley, R., Spiker, S. y Oliver, D. (1970) Biochim. Biophys. Acta 214, 216

Panyim, S., Bilek, D. y Chalkley, R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4206

Patthy, L., Smith, E.L. y Johnson, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6834

Pérez-Aranda, A. (1975) Tesis Doctoral. Facultad Química, Universidad Complutense, Madrid

- Phillips, D.M.P. (1958) Biochem. J. 68, 35
- Phillips, D.M.P. y Clarke, M. (1970) J. Chromatogr 46, 320
- Phillips, D.M.P. y Johns, E.W. (1959) Biochem. J. 72, 538
- Phillips, D.M.P. y Johns, E.W. (1965) Biochem. J. 94, 127
- Pieri, M.J., Vaugien, C. y Camus, M.G. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1253
- Raaf, J y Bonner, J. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 125, 567
- Rall, S.C. y Cole, R.D. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7175
- Rasmussen, P.S., Murray, K. y Luck, J.M. (1962) Biochemistry 1, 79
- Reynolds, J.A. y Tanford, C.A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5161
- Rizzo, P.J. y Nooden, L. (1972) Science 176, 796
- Rojo, M.C. (1975) Tesis Doctoral. Fac. Farmacia Univ. Complutense Madrid
- Sautiere, P., Lambelin-Breynaert, M.D., Moschetto, Y. y Biserte, G. (1970) C. R. Acad. Sci., Ser. D 271, 364
- Sautiere, P., Lambelin-Breynaert, M.D., Moschetto, Y. y Biserte, G. (1971 a) Biochimie 53, 711
- Sautiere, P., Tyron, D., Moschetto, Y. y Biserte, G. (1971 b) Biochimie 53, 479

Sautiere, P., Tyron, D., Laine, B., Mizon, J., Lambelin-Breynaert, M.D., Ruffin, P. y Biserte, G. (1972) C.R. Acad. Sci., Ser. D 274, 1422

Sautiere, P., Kmiecik, D., Loy, O., Briand, G., Biserte, G., Garel, A. y Champagne, M. (1975) FEBS Lett 50, 200

Shapiro, A.L., Viñuela, E. y Maizel, J.N. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815

Shaw, L.M.J. y Huang, R.C. (1970) Biochemistry 9, 4530

Shih, T.Y. y Bonner, J. (1970) J. Mol. Biol. 48, 469

Shih, T.Y. y Fasman, G.D. (1971) Biochemistry 10, 1675

Smart, J.E. y Bonner, J. (1971) J. Mol. Biol. 58, 651

Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1029

Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1974) Biochemistry 13, 4046

Smithies, O. (1955) Biochem. J. 61, 629

Sotirov, N. y Johns, E. W. (1972) Exp. Cell. Res. 73, 13

Stedman, E. y Stedman, E. (1950) Nature 166, 780

Stedman, E. y Stedman, E. (1951) Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B 235, 565

Strickland, M., Stricklan, W.N., Brandt, W.F. y von Holt, C. (1974) FEBS Lett. 40, 346

- Subirana, J.A. (1971) FEBS Lett. 16, 133
- Teller, D.C., Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 739
- Tombs, M.P., Souter, F. y MacLagan, N.F. (1959) Biochem. J. 73, 167
- Tonino, G.J.M. y Rozijn, T.H. (1966) Biochim. Biophys. Acta 124, 427
- Toniolo, C. (1970) J. Phys. Chem. 74, 1390
- Tuan, D.Y.H. y Bonner, J. (1969) J. Mol. Biol. 45, 59
- van den Broek, H., Sevall, J.S., Nooden, L. y Bonner, J. (1973) Biochemistry 12, 229
- van der Westhuyzen, D.R., Böhm, E.L. y von Holt, C. (1974) Biochim. Biophys. Acta 359, 341
- Vidali, G y Neelin, J.M. (1968) Eur. J. Biochem. 5, 330
- Wagner, T.E. (1970) Nature 227, 65
- Wang, T.Y. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1220
- Webb, J.M. y Levy, H.B. (1958) Methods of Biochem. Anal. 6, 1
- Weber, K. y Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406
- Wickett, R.R., Li, H.J. e Isenberg, I. (1972) Biochemistry 11, 2952
- Wigle, D.T. y Dixon, G.H. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5636
- Wilhelm, X. y Champagne, M. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 102

Wilson, R.K., Starbuck, W.C., Taylor, C.W., Jordan, J. y Busch, H. (1970) Cancer Res. 30, 2942

Winterberger, V., Smith, P. y Letnansky, K. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 123

Wishnia, A. y Saunders, M. (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 4285

Wong, T.K. y Marushige, K. (1975) Biochemistry 14, 122

Yeoman, L.C., Olson, M.O.J., Nobuhiki, S., Jordan, J.J., Taylor, C.W., Starbuck, W.C. y Busch, H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6018

Zubay, G. y Doty, P. (1959) J. Mol. Biol. 1, 1

Zubay, G. y Wilkins, M.H.F. (1962) J. Mol. Biol. 4, 444

